

Aus der Klinik und Poliklinik für Orthopädie,
Physikalische Medizin und Rehabilitation
Klinikum der Ludwig - Maximilians - Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dipl. - Ing. V. Jansson

**Immunhistochemische Analyse
der Entzündungsreaktion im murinen Kniegelenk
nach Partikel- /Ionenstimulation**



Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig - Maximilians - Universität München

vorgelegt von
Sabine C. Dirmeier

aus
Landshut

2021

Mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Sandra Utzschneider

Mitberichterstatter: PD Dr. Attila Aszódi
PD Dr. Volker Braunstein

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Alexander Paulus

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.11.2021

*In tiefer Dankbarkeit und Liebe
meinen Eltern gewidmet*

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis.....	6
2	Einleitung.....	7
3	Grundlagen.....	10
3.1	Histologie des Kniegelenks.....	10
3.2	Periprotehetische Membran und biologische Reaktion auf Abrieb.....	11
3.3	Knochenresorption als Folge der Inflammation.....	12
3.4	Abrieb orthopädischer Prothesenmaterialien.....	13
3.4.1	Metallpartikel.....	14
3.4.2	Metallionen.....	15
3.4.3	Polyethylenpartikel.....	15
3.5	Entzündungsmediatoren und Zellen der Immunabwehr.....	16
3.5.1	Zytokine.....	16
3.5.1.1	TNF α	16
3.5.1.2	IL - 1 β	17
3.5.1.3	IL - 6.....	17
3.5.2	Zellen der Immunantwort.....	18
3.5.2.1	Cluster of differentiation antigens (CD).....	18
3.5.2.1.1	CD 3.....	18
3.5.2.1.2	CD 45.....	19
3.5.2.1.3	CD 68.....	19
4	Zielsetzung.....	20
5	Material und Methoden.....	21
5.1	Material.....	21
5.1.1	Generierung und Analyse der Partikel und Ionen.....	21
5.1.1.1	Metallpartikel.....	21
5.1.1.2	Metallionen.....	22
5.1.1.3	Polyethylenpartikel.....	22
5.1.2	Partikel- /Ioneninjektion im murinen Modell.....	23
5.2	Methoden.....	24
5.2.1	Immunhistochemie (IHC).....	24
5.2.1.1	Vorbereitung der Gewebeschnitte für die IHC.....	24
5.2.1.2	Entkalkung und Entwässerung.....	24
5.2.1.3	Paraffinblockherstellung.....	24

5.2.1.4	Herstellung der Gewebeschnitte.....	24
5.2.1.5	Theoretische Grundlagen der Immunhistochemie.....	25
5.2.1.6	Polymer - Methode.....	25
5.2.1.7	Durchführung der Immunhistochemie.....	26
5.2.1.7.1	Vorbereitung.....	26
5.2.1.7.2	Entparaffinierung und Hitze - induzierte Demaskierung.....	27
5.2.1.7.3	Peroxidase - Block.....	27
5.2.1.7.4	Primär - Antikörper.....	28
5.2.1.7.5	Sekundär - Antikörper.....	28
5.2.1.7.6	Chromogen und Gegenfärbung.....	28
5.2.1.7.7	Entwässerung und Eindeckung.....	29
5.3	Auswertung.....	29
5.3.1	Histologische Auswertung.....	29
5.3.2	Statistische Auswertung.....	29
5.4	Material für Gewebepvorbereitung und Immunhistochemie.....	30
5.4.1	Geräte.....	30
5.4.2	Verbrauchsmaterialien.....	31
5.4.3	Reagenzien.....	32
5.4.4	Antikörper - Konzentrate.....	33
5.4.5	Zubereitete Puffer und Lösungen.....	34
6	Ergebnisse.....	35
6.1	Ergebnisse der Entzündungsreaktion im linken Kniegelenk.....	35
6.1.1	TNF α - positive Zellen im Synovialgewebe der linken Kniegelenke.....	35
6.1.2	IL - 6 - positive Zellen im Synovialgewebe der linken Kniegelenke.....	38
6.1.3	IL - 1 β - positive Zellen im Synovialgewebe der linken Kniegelenke.....	41
6.1.4	CD 68 - positive Zellen im Synovialgewebe der linken Kniegelenke.....	43
6.1.5	CD 45 - positive Zellen im Synovialgewebe der linken Kniegelenke.....	46
6.1.6	CD 3 - positive Zellen im Synovialgewebe der linken Kniegelenke.....	49
6.2	Ergebnisse der Entzündungsreaktion der rechten Kniegelenke.....	52
6.2.1	TNF α - positive Zellen im Synovialgewebe der rechten Kniegelenke.....	52
6.2.2	IL - 6 - positive Zellen im Synovialgewebe der rechten Kniegelenke.....	54
6.2.3	IL - 1 β - positive Zellen im Synovialgewebe der rechten Kniegelenke.....	56
6.2.4	CD 68 - positive Zellen im Synovialgewebe der rechten Kniegelenke.....	58
6.2.5	CD 45 - positive Zellen im Synovialgewebe der rechten Kniegelenke.....	60
6.2.6	CD 3 - positive Zellen im Synovialgewebe der rechten Kniegelenke.....	62

7	Diskussion.....	65
8	Zusammenfassung.....	79
9	Anhang.....	80
10	Abbildungsverzeichnis.....	81
11	Tabellenverzeichnis.....	84
12	Literaturverzeichnis.....	84
13	Danksagung.....	98
	Eidesstattliche Versicherung.....	99

1 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ALVAL	adverse lymphocyte - dominated vasculitis - associated lesion
ARMD	adverse reactions to metal debris
CD	cluster of differentiation
CoCrMo	Cobalt - Chrom - Molybdän
DAB	3,3 - Diaminobenzidin
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GP	Gleitpaarung
HRP	horse - redish - peroxidase
HXLPE	highly cross - linked polyethylene
IHC	Immunhistochemie
IL-1 β	Interleukin - 1 β
IL-6	Interleukin - 6
LCA	leukocyte common antigen
MI	Metallionen
MoP	metal - on - polyethylene (Metall - auf - Polyethylen)
MoM	metal - on - metal (Metall - auf - Metall)
MP	Metallpartikel
NegKo	Negativkontrolle
NK	Natürliche Killer
OPG	Osteoprotegerin
OT	Objekträger
PBS	phosphate - buffered - saline
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PE	Polyethylenpartikel
RANK	Receptor Activator of NF - κ B
RANKL	Receptor Activator of NF - κ B Ligand
RT	Raumtemperatur
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TCR	T - Cell - Receptor
TNF α	Tumornekrosefaktor - α
UHMWPE	Ultra High Molecular Weight Polyethylene

2 Einleitung

Der künstliche Gelenkersatz zählt zu den erfolgreichsten Operationen des letzten Jahrhunderts [2, 3], allen voran der prothetische Hüftersatz [4, 5].

Allein in Deutschland wurden im Jahr 2018 über eine viertel Million Hüftendoprothesen implantiert [6]. Die Hauptursachen der irreparablen Gelenksdestruktion, welche eine endoprothetische Versorgung erforderlich machen, sind unterschiedlich und können durch Arthrose, Osteoporose, Rheuma oder einem Trauma bedingt sein [7-9].

Der Anteil der unter 50 jährigen liegt hierbei unter 4 % [10], jedoch profitieren immer mehr jüngere, aktivere Patienten von einer Prothese [11, 12], welches einen hohen Anspruch an Widerstandskraft und Haltbarkeit stellt. Ein großes Problem vor dem der behandelnde Arzt und 10 - 15 % der Prothesenträger stehen, ist die vorzeitige Implantatlockerung [13]. Klinisch macht sich dies meist in 15 - 20 Jahren nach Implantation bemerkbar und bedeutet für den Patienten einen Revisionseingriff [14]. Diese Folgeoperationen dauern länger, sind komplikationsreicher und mit höheren Kosten verbunden [15], dabei sind 70 % der Revisionseingriffe der sogenannten aseptischen Prothesenlockerung geschuldet [16].

Diese Art der Lockerung geht nicht mit einer septischen Infektion oder einem Trauma einher [14, 17], sondern entsteht durch einen langsamen Entzündungsprozess im periprothetischen Gewebe, verursacht durch Abriebpartikel, welche unter anderem durch die Artikulation der Prothesenflächen aufeinander entstehen [18, 19].

In den Endoprothesen finden hierbei unterschiedliche Materialkombinationen Anwendung, darunter Polyethylen, Metall oder Keramik. Bei Gleitpaarungen (GP) mit Keramik bestand anfänglich eine hohe Gefahr des Prothesenbruchs mit sofortigem Funktionsverlust des Gelenks [20]. Moderne Keramik - Keramik - GP weisen mittlerweile ein geringeres Implantatbruchrisiko auf, jedoch sind diese sehr teuer und können Klicken oder Quietschen [20-23]. Daneben gibt es für deren Einsatz limitierende Faktoren wie beispielsweise ein zu hoher BMI, durch den sich das Bruchrisiko wieder drastisch erhöht [22]. Die erste Generation der Metall - auf - Metall - Gleitpaarungen (MoM - GP) zeigte sich jahrzehntelang im Ergebnis frustan [24]. Vielversprechender waren zunächst Metall - auf - Polyethylen - GP (MoP - GP), jedoch gingen diese langfristig mit einem hohen Abrieb einher und jede zweite Prothese musste aufgrund abriebbedingter Komplikationen revidiert werden [24]. Anfang der 90er wurden die MoM - GP in überarbeiteter Form als zweite Generation reaktiviert und gewannen als abriebärmere Variante wieder an Bedeutung [25].

Die Verwendung von Metall - in Form von Oberflächenersatzimplantaten, sog. Hüftkappenprothesen - bot einige Vorteile. Verglichen mit der konventionellen totalen Hüftendoprothese, wird der Femurkopf nur „überkront“ [26], wodurch deutlich Knochen eingespart wird und im Hinblick auf eine spätere Revision von Bedeutung wäre [27].

Von Vorteil zeigte sich auch die Verwendung von Metall bei der Problemlösung eines weiteren triftigen Revisionsgrundes, nämlich die Luxation eines Prothesengelenks [28]. Diesem Problem wurde mit einem größeren Prothesenkopf begegnet, jedoch nahm mit steigendem Kopfdurchmesser bei Gleitpaarungen mit konventionellem Polyethylen der Abrieb zu [29, 30]. MoM - GP hingegen wiesen trotz zunehmenden Kopfdurchmessers weniger Abrieb auf [31] und boten zudem mehr Stabilität sowie einen größeren Bewegungsspielraum [30, 32, 33]. Abrieb sollte bestmöglich vermieden werden, so waren die Erwartungen an die zweite Generation der MoM - GP hoch, die Rate der Implantatversager zu reduzieren [30, 34, 35]. Hingegen aller positiven Erwartungen, verglichen mit anderen Gleitpaarungen, wurden jedoch für MoM - GP die höchsten Revisionsraten und Versagerquoten dokumentiert [36-38] mit auch nur kurzer Standzeit der vielversprechenden Oberflächenersatzprothesen [39-41].

Klinische Befunde wie die abriebbedingte Osteolyse bildeten sich deutlich eher aus als es bei Gleitpaarungen mit Polyethylen der Fall war [42].

Vermehrt häuften sich Berichte über metall - induzierte periprotehetische Weichteilreaktionen - sogenannte ARMD (adverse reactions to metal debris) - [43], welche teilweise mit lokalen Nekrosen einhergehen [43] und in der Zerstörung des Knochens münden können [37].

Ferner konnte nach Metallprothesen - Implantation ein Konzentrationsanstieg von Metallionen sowohl im Körper [44-47] als auch in der Synovia gemessen werden, vor allem bei Patienten die Symptome beklagten oder klinisch durch eine ARMD auffällig wurden [48, 49].

Eine systemische Verteilung des Abriebs konnte zudem beobachtet werden, nachdem auch in entfernt liegenden Organen wie Leber, Milz oder paraaortalen Lymphknoten Abriebpartikel gefunden wurden [50, 51].

Nach dem heutigen Stand der Forschung ruft Implantatabrieb Entzündungsprozesse hervor, mit nachfolgender Osteolyse und Prothesenlockerung [52-55].

Auf mikrobiologischer Ebene betrachtet, sind die Hauptinitiatoren dieser Entzündungsreaktionen Makrophagen, welche proinflammatorische Zytokine wie $TNF\alpha$, IL - 1 β und IL - 6 freisetzen [56-62]. Diese rekrutieren und involvieren weitere

immunkompetente Zellen, welche über komplexe Signalkaskaden Osteoklasten aktivieren und so vermehrt Knochen abbauen [63, 64].

Hierbei spielen Anzahl, Größe, Konzentration und Form der Partikel eine zusätzliche Rolle bei der Intensität der Inflammationsreaktion [65-69].

Daher sind die Bestrebungen sehr groß, das Material abriebresistenter zu gestalten. Trotz aller bisherigen Verbesserungen der Materialeigenschaften bleibt das Problem der vorzeitigen Prothesenlockerung weiter bestehen. Die Komplexität dieser Entzündungsprozesse ist bis heute nicht endgültig geklärt und wirft weiterhin viele Fragen auf.

Ziel dieser Studie war es zum einen mittels immunhistochemischer Analysen die Intensität der Entzündungsreaktion des Gewebes auf Metallpartikel zu untersuchen und diese mit der Gewebereaktion von Metallionen und konventionellem Polyethylenpartikeln zu vergleichen. Zum anderen ist weiterhin unklar, inwiefern Metallabrieb befähigt ist, neben lokalen auch systemische Reaktionen auszulösen, weshalb die Studie auch dieser Fragestellung nachging.

Hierzu wurden Metallpartikel und Ionen aus einer Cobalt - Chrom - Molybdän - (CoCrMo) - Legierung, sowie konventionelles UHMWPE (Ultra High Molecular Weight Polyethylene) verwendet.

3 Grundlagen

3.1 Histologie des Kniegelenkes

In dieser Studie stellt das Synovialgewebe des murinen Kniegelenks die Ausgangsbasis für die Provokation einer abriebinduzierten Inflammation dar und wird so der Gewebereaktion im menschlichen Hüftgelenk nach Prothesenimplantation nachempfunden. Der strukturelle und histologische Aufbau eines Gelenks soll an dieser Stelle nochmal einen kurzen Überblick verschaffen.

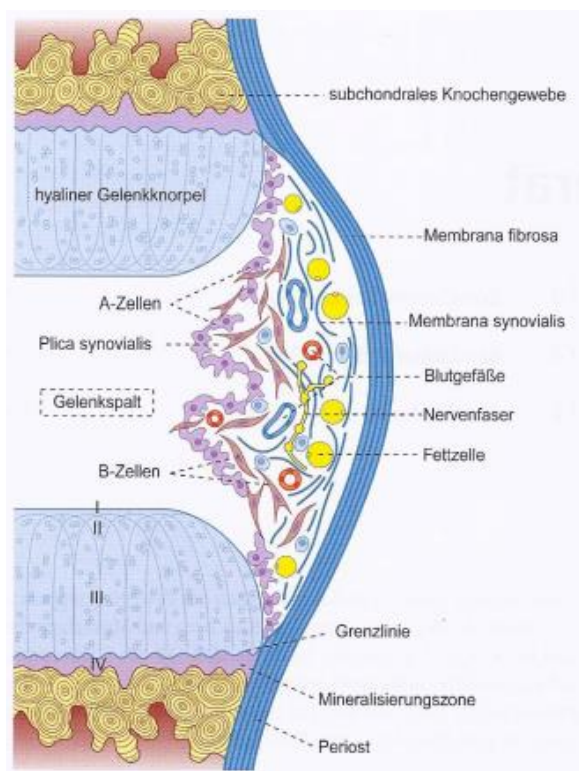


Abb. 1 zeigt den histologischen Aufbau eines Gelenkes. Dargestellt sind u.a. die Gelenkkapsel mit der äußeren Membrana fibrosa und der inneren Membrana synovialis mit A- und B-Synoviozyten, sowie das subintimale Gewebe mit Blutgefäßen und Fettzellen. [1]

Die Gelenkkapsel besteht aus einer äußeren Membrana fibrosa (Stratum fibrosum) und einer inneren Membrana synovialis (Stratum synoviale). Letztere ragt dabei falten- und zottenreich in die Gelenkhöhle hinein und unterteilt sich wiederum in zwei Schichten [1]: Die synoviale Intima bildet dabei die innere Schicht. Diese ist kein Epithel und besitzt auch keine Basalmembran, sondern setzt sich vielmehr aus ein bis vier Lagen locker geschichteten Deckzellen (Synoviozyten) zusammen [1, 70]. Dieses synoviale Gewebe besteht aus zwei unterschiedlichen Zelltypen: Typ - A - Zellen, entsprechen Makrophagen, die durch Phagozytose die Gelenkhöhle reinigen und Typ - B - Zellen, entsprechen Fibroblasten, welche die Synovialflüssigkeit sowie die Bindegewebsmatrix produzieren [4, 70].

Die Synovialflüssigkeit säubert durch Abtransport von Metaboliten die Gelenkhöhle, ernährt den Knorpel und dient als Gelenkschmiere [70, 71]. Die äußere subintimale Schicht der Membrana synovialis besteht aus lockerem Bindegewebe, ist blut- und lymphgefäßreich und enthält neben vielen Fettzellen, vegetative Nervenfasern [1].

Nach außen wird das Gelenk von der Membrana fibrosa aus straffem Bindegewebe stabilisiert und ist mit dem Periost verbunden [1].

3.2 Periprothetische Membran und biologische Reaktion auf Abrieb

Nach Implantation einer Hüftprothese werden kontinuierlich Abriebpartikel freigesetzt [15, 72], dabei verursachen alle Materialkomponenten wie Metall, Keramik oder Polyethylen eine akute oder chronische Entzündungsreaktion im angrenzenden Gewebe, die letztendlich zur Implantatlockerung führen kann [53, 73-76].

Zwischen Implantatoberfläche und Knochen bildet sich eine sogenannte periprothetische Membran aus [77-79] - oft als Pseudomembran bezeichnet - in der englischsprachigen Literatur wird gern synonym der Begriff „synovial - like interface membrane“ (SLIM) genutzt [80]. Diese Membran kann massiv expandieren, was oft bei gelockerten Prothesen beobachtet wird [81].

Sie enthält reichlich Makrophagen und Fibroblasten, wodurch sie dem Synovialgewebe sehr stark ähnelt sowie multinukleäre Riesenzellen, Abriebpartikel und vereinzelt Lymphozyten, welche im Zusammenspiel inflammatorische Prozesse erzeugen und so den angrenzenden Knochen zerstören können [14, 82-85].

Der Partikelkontakt provoziert sämtliche Zellen im umgebenden Gewebe im Sinne einer inflammatorischen Antwort: Makrophagen setzen proinflammatorische Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$, IL - 1 und IL - 6 frei und rekrutieren dadurch weitere Makrophagen [15, 56-58, 60, 61, 86].

Diese Entzündungsreaktion bewirkt am Knochen, dass Osteoblasten ihre Fähigkeit verlieren, ausreichend Knochenmatrix zu produzieren [87], Osteoklasten vermehrt den Knochen abbauen [86] und bei diesem Vorgang von Makrophagen selbst unterstützt werden [88], bis sich das Implantat letztendlich lockert.

3.3 Knochenresorption als Folge der Inflammation

Die aseptische Prothesenlockerung ist Folge einer vermehrten Resorption und eines gedrosselten Wiederaufbaus des Knochens [4]. Einige Studien, auch im Tiermodell, konnten zeigen, dass die partikelinduzierte Inflammation nicht nur die Knochenresorption durch Osteoklasten hochreguliert, sondern auch die Osteoblastenfunktion im Knochenaufbau hemmt [89-92]. So reagieren bspw. Osteoblasten bei Partikelkontakt mit einer erhöhten Apoptoserate oder schränken ihre Kollagensynthese für die Knochenmatrix ein [93]. Nach Phagozytose von Partikeln setzen Makrophagen und Fibroblasten proinflammatorische Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$, IL - 1 β und IL - 6 frei [69, 94, 95], welche vermehrt Osteoklasten anregen, Knochen abzubauen und weitere Osteoklasten zu rekrutieren [4, 96-98].

Des Weiteren können sich Makrophagen selbst in knochenresorbierende Osteoklasten differenzieren und sich am pathologischen Abbau beteiligen [88, 99-102].

Eine Schlüsselrolle in der Osteoklastendifferenzierung und -aktivierung nimmt dabei das Ungleichgewicht von RANK (Receptor Activator of NF - κ B) und RANKL (Receptor Activator of NF - κ B Ligand), zu dessen Gegenspieler OPG (Osteoprotegerin) ein [63, 103, 104].

RANK wird als Rezeptor auf reifen Osteoklasten und deren Vorläuferzellen exprimiert [105]. Sein Ligand ist RANKL, welcher bei Bindung Vorläuferzellen zur Differenzierung stimuliert, reife Osteoklasten zur Knochenresorption aktiviert [106, 107] und deren Apoptose verhindert [108-110].

Die proinflammatorischen Zytokine $\text{TNF}\alpha$, IL - 6 und IL - 1 β stimulieren dabei Osteoblasten und Fibroblasten RANKL zu bilden [95, 97, 98, 111].

Letzteres wurde auch in erhöhter Konzentration in entzündeten Gelenken gemessen und von Synoviozyten oder aktivierten T - Zellen produziert [103]. OPG ist der physiologische Gegenspieler zu RANKL und wird von Osteoblasten sezerniert. Diese zeigen bspw. bei Partikelkontakt eine geringere OPG - Expression [112] zu Gunsten der Osteoklastogenese.

Dieses Ungleichgewicht zwischen erniedrigtem OPG und erhöhter RANKL - Konzentration wurde auch in der Synovialflüssigkeit von Patienten gefunden, die sich klinisch mit einer aseptischen Prothesenlockerung präsentierten [113].

3.4 Abrieb orthopädischer Prothesenmaterialien

In der Hüftendoprothetik existieren unterschiedliche Gleitpaarungen: Metall - Metall -, Metall - Polyethylen -, Keramik - Keramik - oder auch Keramik - Polyethylen - Gleitpaarungen [114]. Dabei beschreibt das erstgenannte Material den Hüftkopfersatz, das Zweite den Pfannenersatz. Eine Metall - Polyethylen - Gleitpaarung besitzt so einen Femurkopfersatz aus Metall, der dazugehörige Pfanneneinsatz besteht aus Polyethylen [26].

Neben Totalendoprothesen (TEP) der Hüfte, bei denen Femurkopf als auch Pfanne ersetzt werden [115], gibt es knochensparende Varianten wie den Oberflächenersatz (engl. resurfacing), bei dem der Hüftkopf belassen und nur mit einer Metallkappe überzogen wird [26].

Die Metalllegierung setzt sich dabei meist aus Cobalt, Chrom und Molybdän zusammen. Beim Polyethylen handelt es sich um konventionelles UHMWPE (Ultra High Molecular Weight Polyethylene) oder um kreuzvernetztes UHMWPE (HXLPE = Highly Crosslinked Polyethylene).

Allen Gleitpaarungen gemeinsam ist das Problem des unvermeidlichen Abriebs, der Hauptinitiator einer Entzündungsreaktion und der folgenden aseptischen Prothesenlockerung ist [18].

Abrieb beschreibt den Materialverlust von Oberflächen, die aufeinander gleiten, wie es bspw. unter Bewegung bei Prothesen der Fall ist [79]. Die entstehenden Partikel zeigen materialabhängig Unterschiede in ihrer Größe, Form, Konzentration, Volumen und Anzahl [65-69]. Diese Unterschiede - vor allem die Größe - spielen eine wichtige Rolle in der entzündlichen Komponente der Gewebereaktion [65-67, 116].

Partikel müssen kleiner als 10 µm sein, um von Makrophagen phagozytiert und beseitigt werden zu können [4, 14, 58, 89, 117]. Jedoch haben genau diese Partikel das höchste inflammatorische Potenzial, wenn sie zwischen 0,24 und 7,2 µm groß sind [4]. Größere Partikel > 10 µm können nicht phagozytiert werden und werden von Makrophagen umrandet [118]. Letztere fusionieren zu multinukleären Fremdkörper - Riesenzellen und schotten so große Partikel vom Gewebe ab [56, 119, 120].

Diese Fremdkörper - Riesenzellen können je nach vorliegendem Biomaterial, zersetzende Enzyme und Sauerstoffradikale freisetzen, was zum Abbau des Materials führen kann [121, 122] oder zu deren Zelltod [123].

Ferner entscheidet auch das Abriebvolumen das Ausmaß der Osteolyse, je weniger Abrieb, desto weniger Knochensubstanzverlust [124].

3.4.1 Metallpartikel

Die Legierung bei Metall - Metall - Gleitpaarungen (MoM - GP) setzt sich meist aus Cobalt, Chrom und Molybdän (CoCrMo) zusammen und gilt als Goldstandard für diese Prothesenart [125].

MoM - GP zeichnen sich durch eine gute Stabilität sowie ein geringes Bruchrisiko aus [2, 126] und weisen einen 10 bis 40 fach geringeren Abrieb auf, als es bei MoP (Metall - Polyethylen) - GP der Fall ist [4].

Metallpartikel (MP) sind wesentlich kleiner als Polyethylenpartikel (PE), im Durchschnitt erreichen sie eine Größe von 0,03 - 200 µm, wobei die Mehrheit der Partikel eine Größe < 0,05 µm aufweist [58, 127-129] und für Makrophagen im phagozytierbaren Bereich liegen [4, 14, 58, 89]. Die Freisetzung der Metallpartikel erfolgt unter anderem durch Abrasion sowie Materialerschöpfung, wenn die Oberflächen aufeinander gleiten [79].

Mit überwiegend metallhaltigen Prothesendesigns werden teilweise schwere Weichteilreaktionen assoziiert.

Der Überbegriff „ARMD“ (adverse reactions to metal debris) [43] fasst hierbei gebräuchliche Begriffe zusammen, wie die Metallose [43], Pseudotumore ([130, 131] oder ALVAL (adverse lymphocyte - dominated vasculitis - associated lesion) [132].

Pseudotumore sind Weichteilwucherungen nicht - neoplastischen sowie aseptischen Ursprungs und wurden vermehrt bei jungen Frauen in Assoziation zu einer metallhaltigen Prothese dokumentiert [130, 131, 133-135].

Die Metallose äußert sich in lokalen Nekrosen mit aseptischer Fibrosierung [43, 136] und ALVAL meint ein perivaskuläres, diffuses Infiltrat überwiegend aus Lymphozyten bestehend sowie Makrophagen und Granulozyten [43, 132]. ALVAL wird dabei histologisch diagnostiziert und unterscheidet sich von anderen chronisch - entzündlichen Arthropathien durch ausgeprägte Gewebsnekrosen [43].

Die Metallpartikel werden hierbei nicht nur lokal im Bereich der Prothese beobachtet, sondern auch in entfernt liegenden Organen wie Leber, Knochenmark, paraaortale Lymphknoten und Milz [50, 137, 138]. Metallinduzierte Entzündungsreaktionen fernab von der Prothese im Sinne einer systemischen Inflammation sind bisher noch nicht eindeutig vorbeschrieben.

3.4.2 Metallionen

Abrieb und Korrosionsprozesse erzeugen neben Metallpartikeln auch Metallionen wie Cr^{3+} , Cr^{6+} , Co^{2+} und Mo^{5+} [127, 139-142]. Zusätzlich können umliegende Gewebszellen Nanopartikel aufnehmen und intrazellulär einem oxidativen Milieu aussetzen, das eine Ionenfreisetzung bewirkt [143-145]. Dabei scheinen MoM - Gleitpaarungen mehr Ionen zu erzeugen, als es bei MoP - Gleitpaarungen der Fall ist, zumindest zeigen dies erhöhte Messwerte von Cobalt- und Chromionen - Konzentrationen, gemessen in Erythrozyten und im Urin bei Patienten [47].

Erhöhte Metallionenkonzentrationen im Serum und der Synovia, konnten oft nach einer Endoprothesenimplantation festgestellt werden [35, 44-46, 146]. Diese stehen in Verdacht mit Osteolysen und Weichteilreaktionen positiv zu korrelieren [147].

Einige Studien empfehlen daher die Messung der Metallionenkonzentration im Serum, um ein vorzeitiges Implantatversagen zu erkennen [146, 148]. Inwiefern ein beobachteter Anstieg dieser Metallspiegel im Blut wirklich eine Fehlfunktion der Prothese prognostizieren kann, wird weiterhin kontrovers diskutiert [149, 150].

Obwohl Cobalt und Chrom wichtige Bausteine beispielsweise körpereigener Enzyme sind, können diese bei zu hohen Konzentrationen DNA - Schäden hervorrufen oder kanzerogen wirken [151-153]. Aus Prothesen freigesetzte Metallionen können von körpereigenen Proteinen gebunden werden und sogenannte Haptene formen [143, 154]. Es wird vermutet, dass solche Haptene allergische Reaktionen in Form einer verspäteten Typ - IV - Hypersensitivitätsreaktion auslösen können, welche durch T - Lymphozyten vermittelt wird [58, 155].

Desweiteren provozieren Metallionen die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine zu Gunsten der Osteolyse [151, 156-158].

Wie Metallpartikel wurden Metallionen ebenfalls verstreut im Körper vorkommend dokumentiert, wie in Leber, Milz, Lunge und in den Nieren [50, 51].

3.4.3 Polyethylenpartikel

UHMWPE ist ein Kunststoff und wurde durch Sir John Charnley 1962 publik [159]. Lange Zeit galt es als Goldstandard für Gelenkflächenersatz aufgrund seiner hohen Belastbarkeit und Bruchsicherheit [160-162], jedoch zeigte es in seinen Anfängen ein hohes Abriebvolumen [163, 164].

Durch Oxidationsprozesse, die sowohl während der Herstellung des Polyethylens als auch nach erfolgter Implantation in vivo entstehen, werden freie Radikale erzeugt [165]. Diese machen das Material spröde, verringern die Widerstandskraft und Abrieb entsteht [166].

Polyethylenpartikel weisen dabei eine durchschnittliche Größe von 0,5 µm [167] auf und liegen wie Metallpartikel im phagozytischen Bereich der Makrophagen [4, 14, 58, 89, 117].

Mittels Kreuzvernetzung konnten die Materialeigenschaften des Polyethylens deutlich verbessert werden [160, 168-170]. Gamma- oder Betabestrahlung führt im Herstellungsprozess zu einer stabileren Version des konventionellen UHMWPE, zum sogenannten highly - crosslinked - UHMWPE (HXLPE) [171].

Durch die Anwendung von hochkruzvernetztem Polyethylen konnte im mittelfristigen Vergleich bezüglich der Standzeit kaum ein Unterschied zu Keramik - auf - Keramik, Metall - auf - Polyethylen - oder Keramik - auf - Polyethylen - Endoprothesen festgestellt werden [172]. Das HXLPE macht sich im Vergleich zu seinem Vorgänger im Rückgang der Osteolyse - [173, 174] und Revisionsraten [175] bemerkbar.

3.5 Entzündungsmediatoren und Zellen der Immunabwehr

3.5.1 Zytokine

Zytokine sind kleine Proteine mit immunologischen Effekten, die vor allem im Rahmen der Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle einnehmen [176]. Durch unterschiedliche Stimuli werden diese von Zellen des angeborenen als auch erworbenen Immunsystems freigesetzt [177] und können im Rahmen der Zellkommunikation auto- oder parakrin wirken [178]. Zur Gruppe der Zytokine gehören Interleukine, Interferone, Chemokine sowie die TNF - Familie und die hämatopoetischen Wachstumsfaktoren [62, 178].

Wie schon in vielen Studien gezeigt wurde, sind vor allem die Zytokine TNF α , IL - 1 β und IL - 6 wichtige Trigger der Inflammation im Periimplantatgewebe mit nachfolgender Prothesenlockerung [61, 179, 180].

3.5.1.1 TNF α

TNF α , ein Zytokin, das vor allem in der angeborenen Immunität eine wichtige Rolle spielt, wird besonders von aktivierten Makrophagen, Monozyten und T - Zellen

sezerniert [62]. Die Aktivierung von Makrophagen kann durch die Phagozytose von Abriebpartikeln entstehen [69, 94]. Die dadurch bedingte TNF α - Freisetzung rekrutiert weitere Makrophagen [82, 181] und steigert deren Phagozytoseaktivität [62]. Auf fast allen Zellen im Gewebe befinden sich spezifische Rezeptoren für TNF α [177], deren Aktivierung neben vielen anderen biochemischen Prozessen, die Induktion von Genen bewirkt [177], die für eine Entzündungsreaktion stehen. Bspw. bewirken Endothelzellen unter dem Einfluss von TNF α eine Expression von Adhäsionsmolekülen, die Leukozyten die Einwanderung ermöglichen [177]. Bei der Entzündungsreaktion bewirkt TNF α zudem eine erhöhte Gefäßpermeabilität mit Flüssigkeitsaustritt [177, 182], das sich klinisch als Schwellung präsentiert [183].

Vor allem im Hinblick auf die Osteolyse, die zur aseptischen Prothesenlockerung führt, unterstützt TNF α die Differenzierung und das Überleben der Osteoklasten [15, 64]. Osteoblasten werden darüber hinaus stimuliert RANKL zu bilden, ein weiterer Faktor der eine Schlüsselrolle in der Osteolysekaskade spielt [15, 62].

3.5.1.2 IL - 1 β

IL - 1 β zählt wie TNF α zu den Entzündungsmediatoren und tritt fast immer nachgeordnet nach diesem auf [62]. Dieses Interleukin wird hauptsächlich von Makrophagen und Endothelzellen gebildet [95]. Seine Funktion ist die Aktivierung von T - Zellen und die Rekrutierung weiterer Makrophagen [184, 185]. Desweiteren induziert IL - 1 β Endothelzellen IL - 6 zu produzieren (ein weiteres wichtiges proinflammatorisches Zytokin) und wirkt stimulierend auf das Knochenmark, vermehrt Granulozyten auszuschütten [186].

IL - 1 β aktiviert als proinflammatorisches Zytokin ebenso die Expression von Genen, aus denen weitere Entzündungsmediatoren hervorgehen [62]. So stimuliert es auch Fibroblasten RANKL zu exprimieren, das den Knochensubstanzverlust vorantreibt [97, 98].

3.5.1.3 IL - 6

Wie TNF α und IL - 1 β ist IL - 6 ebenso ein proinflammatorisches Zytokin [177]. Es wird von Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen und T - Zellen produziert, unterstützt die Differenzierung von T - Zellen und ist für diese wiederum ein wichtiger Aktivator [62, 184]. IL - 6 initiiert nicht nur Entzündungsprozesse, sondern ist auch an der

Aufrechterhaltung entzündlicher Erkrankungen als auch an Osteoporose wesentlich beteiligt [62]. Fibroblasten bspw. sezernieren nicht nur IL - 6, sondern werden selbst durch dieses stimuliert RANKL zu exprimieren, das so zur Osteoklastogenese und dem Knochenverlust beiträgt [97, 98].

3.5.2 Zellen der Immunantwort

Die angeborene Immunantwort wird hauptsächlich durch Zellen wie Makrophagen, Granulozyten, Natürliche Killerzellen (NK - Zellen) und dendritische Zellen gewährleistet [62]. Diese Reaktion ist antigenunabhängig und unspezifisch. Ebenso wird kein immunologisches Gedächtnis angelegt [187]. Schafft das angeborene Immunsystem die Bekämpfung des Erregers oder Pathogens nicht, greift nach ca. 4 - 5 Tagen das erworbene Immunsystem ein [62]. Hauptakteure des erworbenen Immunsystems sind u.a. als Subpopulation der Leukozyten, die B - und T - Zellen [177].

3.5.2.1 Cluster of differentiation antigens (CD)

Cluster of differentiation antigens (CD) sind spezifische Membranmoleküle, die eine Differenzierung der Leukozyten - Subpopulationen ermöglichen [62, 177]. Diese Membranmoleküle haben eine Rezeptor- und/oder Signalfunktion [62]. Die Detektierung dieser Membranmoleküle und damit spezifischer Zellen, kann bspw. im Rahmen einer immunhistochemischen Analyse durch Antikörper erfolgen.

3.5.2.1.1 CD 3

CD 3 ist ein Cofaktor des Antigenrezeptorkomplexes speziell von T - Zellen und kann immunhistochemisch detektiert werden [62, 188].

T - Zellen sind neben B - Zellen als Lymphozyten die Hauptakteure des erworbenen Immunsystems [177]. D.h. sie können, im Gegensatz zu Makrophagen, welche unspezifisch im angeborenen Immunsystem agieren [177], spezifisch auf ein Antigen reagieren und nach ihrer Aktivierung eine Immunantwort auslösen [62, 177, 189].

Exogene Antigene werden von antigenpräsentierenden Zellen (wie Makrophagen) phagozytiert und Fragmente über den MHC - (major histocompatibility complex) - II - Komplex (ein Membranmolekül speziell auf antigenpräsentierenden Zellen) an der

Zelloberfläche präsentiert [177, 185]. T - Zellen reagieren darauf und werden aktiviert [177]. Zusätzlich wird ein Vorkommen von T - Zellen bei Typ - IV - Hypersensitivitätsreaktionen beobachtet, die im Rahmen von allergischen Reaktionen im Sinne einer Kontaktdermatitis auftreten [81, 189].

3.5.2.1.2 CD 45

CD 45, auch als LCA (leukocyte common antigen) bekannt [190], ist eine transmembranäre Tyrosinphosphatase [191]. Ausgenommen der Erythrozyten und Thrombozyten [192], wird diese von allen zellkernhaltigen, hämatopoetischen Zellen exprimiert, wie Granulozyten, Makrophagen/Monozyten, B-, T-, Natürliche Killer- (NK) und dendritische Zellen [62, 193-196]. Dabei können sich die extrazellulären Domänen dieses Proteins unterscheiden und erscheinen in mehreren Isoformen, wie bspw. CD45 - R0 auf T - Gedächtniszellen [192]. Diese Isoformen entstehen durch alternatives Spleißen und sind vom Zelltyp und Aktivierungsstadium der Zellen abhängig [197].

CD 45 ist Modulator in der Signalübertragung zwischen den Zellen [191, 198]. Es erniedrigt beispielsweise die Signalschwelle für die Aktivierung und Entwicklung der B - und T - Lymphozyten [191, 197]. Ein Fehlen oder ein Defekt von CD 45 geht mit einer schweren Funktionsbeeinträchtigung vor allem der Lymphozyten einher und äußert sich in einem schweren Immundefekt [198-200].

3.5.2.1.3 CD 68

Das CD 68 - Antigen wird hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen exprimiert [201]. Monozyten, die in das Gewebe einwandern, differenzieren sich dort zu Makrophagen [62, 202].

Makrophagen sind ein wichtiger Hauptbestandteil des angeborenen Immunsystems und sind in der ersten Abwehr von Erregern oder Fremdmaterial beteiligt [61]. Die Makrophagenaktivierung erfolgt durch Phagozytose bspw. von Partikeln, woraufhin es zu einer Ausschüttung von Zytokinen kommt wie TNF α , IL - 1 β und IL - 6 [58-62].

Letzteres führt zur klassischen Entzündungsreaktion mit lokaler Blutgefäßerweiterung, Leukozytenextravasation und einer erhöhten Gefäßpermeabilität [182], das letztendlich zur Bekämpfung und Eindämmung des Pathogens führen soll [62].

Makrophagen können Partikel phagozytieren die weniger als 10 μ m groß sind [4, 58, 89, 117] und können nach deren Phagozytose lebensfähig bleiben [203].

Größere Partikel sind unverdaulich und werden von mehreren Makrophagen umschlossen [118]. Diese fusionieren zu sogenannten multinukleären Riesenzellen und schotten so das Fremdmaterial vom restlichen Gewebe ab [56, 81, 119].

Makrophagen sind außerdem dazu befähigt sich zu knochenresorbierenden Osteoklasten zu differenzieren [88, 99, 101, 204, 205] und beteiligen sich so zusätzlich an den osteolytischen Prozessen, die die Implantatlockerung vorantreiben [55, 206].

4 Zielsetzung

Die aseptische Prothesenlockerung ist bisher der häufigste Grund für einen Revisionseingriff [207], deren Ursache eine entzündliche Reaktion des periprothetischen Gewebes auf Abriebpartikel mit nachfolgender Osteolyse ist [52-55, 61].

Ziel dieser Studie war, in einem Tiermodell die primäre aseptische Entzündungsreaktion von Metall- als auch Polyethylenpartikeln mit Metallionen zu vergleichen [208].

Desweiteren ist unklar inwiefern eine abriebinduzierte Typ - IV - Hypersensitivitätsreaktion eine Rolle spielt, weshalb speziell T - Lymphozyten in diesem Modell untersucht wurden [208].

Unklar ist auch, inwieweit Partikel oder Ionen befähigt sind neben lokalen auch systemische Reaktionen auszulösen [208]. Hierfür wurden die rechten, unbehandelten Knie der Mäuse auf das Vorliegen von Entzündungszellen untersucht [208].

Um Prothesenstandzeiten dauerhaft zu verbessern ist ein grundlegendes Verständnis der Pathophysiologie der Entzündungsreaktionen auf Abrieb notwendig.

Bisher gibt es keine *in - vivo* Studie, die im direkten Vergleich die Inflammationsreaktion des Gewebes von Ionen und Partikel untersucht.

Ausgehend von der Hypothese, dass osteolytische Prozesse mit nachfolgender aseptischer Prothesenlockerung durch Inflammationsprozesse im Synovialgewebe eingeleitet und unterhalten werden, nutzte diese Studie ein etabliertes *in - vivo* Mausmodell [74, 76, 209-211], das anhand immunhistochemischer Marker (TNF α -, IL - 1 β -, IL - 6 -, CD 68 -, CD

45 - und CD 3 - Antikörper) im murinen Synovialgewebe das inflammatorische Potential der Partikel und Ionen nach intraartikulärer Injektion quantifizieren soll [208].

Diese Arbeit ist Teil eines ganzheitlichen Studienprojektes in der Erforschung des Prothesenabriebs und wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert. Einschließlich dieser Ergebnisse, soll ein Gesamtüberblick hinsichtlich der Inflammationsreaktion im Körper auf Ionen und Partikel des Abriebs geschaffen werden. Der vorausgegangene Tierversuch wurde durch die Regierung von Oberbayern genehmigt (Tierversuchsantrag AZ: 55.2-1-54-2532-82.12).

Der Versuchsaufbau sowie die Ergebnisse dieser Arbeit wurden vorab publiziert (siehe Cheng X., Dirmeier S.C. et al., Biological Reactions to Metal Particles and Ions in the Synovial Layer of Mice. Materials (Basel), 2020 [208]).

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Generierung und Analyse der Partikel und Ionen

5.1.1.1 Metallpartikel

Die Generierung der Metallpartikel erfolgte durch das Labor für Biomechanik und Implantatforschung der Heidelberger Uniklinik. Ein Probekörper mit einer CoCr₂₉Mo₆ - Legierung unterzog sich in einer Pin - on - Plate - Prüfeinheit einem Verschleißtest. Hierbei wurde möglichst der physiologische Verschleiß im Hüftgelenk nachgeahmt [212]. Die Partikelanalyse im Feldemissionsrasterelektronenmikroskop ergab 49% ovale, 44% runde sowie 7% nadelförmige Metallpartikel mit einer mittleren Größe von 61,25 nm +/- 18,47 nm. Die Rundheit wurde mit 0,64 +/- 0,16 dokumentiert [213]. Die so erzeugten Metallpartikel sind vergleichbar mit den klinisch generierten Abriebpartikeln bei Endoprothesen [213].

5.1.1.2 Metallionen

Die Metallionen wurden ebenfalls durch die Arbeitsgruppe aus Heidelberg generiert. Werkstoffproben mit einer $\text{CoCr}_{29}\text{Mo}_6$ - Legierung wurden in PBS mittels Korrosionsmesszelle zur Korrosion gebracht. Durch ein elektrisches Potential wurde die Abgabe von Metallionen forciert [212]. Die Analyse ergab hierbei eine Metall - Gesamtionenkonzentration von 20,5 mg/l [214], welche mittels PBS auf die gewünschte Ziel - Konzentration von 200 µg/l gebracht wurde [208].

Die Ultraspurenanalytik zeigte hierbei eine Zusammensetzung der Lösung mit Metallionen bestehend aus 13,7 mg/L Kobalt, 4,3 mg/L Chrom, 1,7 mg/L Nickel, 0,8 mg/L Molybdän [214]. Eine Endotoxineliminierung der Metallionen - Lösung erfolgte mittels Hitzeinkubation [212].

5.1.1.3 Polyethylenpartikel

Das Labor für Biomechanik und Implantattechnologie der Universität Rostock erzeugte mittels Hüftabrieb - Simulator die quervernetzten Polyethylenpartikel aus einer Keramik - Polyethylen - Gleitpaarung. Der Hüftkopf bestand hierbei aus Al_2O_3 (BioloX[®] forte) und das Pfanneninsert aus quervernetztem Polyethylen (X3TM). Als Testmedium erfolgte die weitere Verarbeitung und Analyse durch das Labor für Biomechanik und experimentelle Orthopädie der LMU München. Es erfolgte zunächst eine Säuredigestion, um organische Bestandteile zu entfernen [215]. Durch ein Rasterelektronenmikroskop wurden die Partikel analysiert. Vor und nach der Analyse wurden potentielle Endotoxine eliminiert nach der Methode von Paulus et al [216]. Eine Endotoxinfreiheit konnte nach Protokoll erreicht werden, jedoch konnten nicht die notwendigen Mengen/Konzentrationen endotoxinfreier PE - Partikel hergestellt werden, um den entsprechenden Bedarf abzudecken.

Daher musste auf kommerziell erwerbliche Partikel gewechselt werden (UHMWPE, Continuum Blue UK). Diese Partikel wurden im Vorfeld seitens des Herstellers auf Endotoxinfreiheit getestet. Diese Partikel waren im Durchmesser 1,07 µm groß und überwiegend rund.

5.1.2 Partikel- /Ioneninjektion im murinen Modell

Haltung, Behandlung, Probengewinnung und Euthanasierung der Mäuse waren Bestandteil eines Teilprojekts der DFG - Studie und erfolgte im Walter - Brendel - Zentrum (Campus Großhadern, LMU München) durch Mitglieder der Arbeitsgruppe der Biomechanik und orthopädischen Forschung (LMU München) im Zeitraum April 2015 bis Oktober 2016 [212] (genehmigt durch die Regierung von Oberbayern; Tierversuchsantrag AZ: 55.2-1-54-2532-82.12). Hierbei wurden weibliche Balb/c Mäuse in vier Gruppen mit jeweils 10 Tieren eingeteilt [212]. Im zweizeitigen Tierversuch wurde den Mäusen unter sterilen Bedingungen und in Inhalationsnarkose in das jeweils linke Knie eine 50 µl Suspension injiziert [212]. Je nach Gruppenzugehörigkeit enthielt diese Suspension Partikel in einer 0,1 volumenprozentigen PBS (phosphate - buffered - saline solution) - Lösung oder Metallionen in einer Konzentration von 200 µg/l [212]. Diese gewählte Konzentration orientierte sich an Spiegel, welche in der Synovia bei Patienten mit Endoprothesenversagen gemessen wurden [48, 146]. Als Negativkontroll (NegKo) - Gruppe dienten Kniegewebeproben fünf unbehandelter Mäuse.

Die Gruppeneinteilung im Überblick:

- MP - Gruppe: CoCr₂₉Mo₆ - Metallpartikel 0,1 Vol.% PBS - Lösung
- MI - Gruppe: CoCr₂₉Mo₆ - Ionen - Konzentration von 200µg/l
- PE - Gruppe: UHMWPE - Partikel 0,1 Vol.% PBS - Lösung
- PBS - Gruppe: 0,1 Vol.% PBS - Lösung
- NegKo - Gruppe: keine Injektion

Nach 7 Tagen Inkubationszeit wurde den Tieren in erneuter Inhalationsnarkose u.a. Kniegelenkscapselgewebe zur weiteren immunhistologischen Diagnostik entnommen [212]. Die Tiere wurden im Anschluss durch eine Überdosis Pentobarbital intrakardial euthanasiert [212]. Um auszuschließen, dass der Vorgang der intraartikulären Injektion selbst (trotz steriler Bedingungen) eine Inflamationsreaktion hervorruft, wurde die PBS - Gruppe generiert [208]. Die PBS - Gruppe selbst sollte sich dabei in der immunhistochemischen Analyse gleich der NegKo - Gruppe (unbehandelte Tiere) verhalten.

Die Tierversuche wurden nach ordnungsgemäßer Antragsstellung durch die Regierung von Oberbayern geprüft und genehmigt. Die Versuche wurden gemäß dem aktuellen Tierversuchsschutzgesetz (§ 7 TierSchG) durchgeführt.

5.2 Methoden

5.2.1 Immunhistochemie (IHC)

5.2.1.1 Vorbereitung der Gewebeschnitte für die IHC

Nach Entnahme der Kniegelenke wurden alle weiterführenden experimentellen Arbeiten im Labor für Biomechanik und Experimentelle Orthopädie der Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Physikalische Medizin und Rehabilitation durchgeführt. Die entnommenen Kniegelenke wurden in 4 % gepuffertem Formalin für mindestens 8 h bei Raumtemperatur (RT) fixiert [208].

5.2.1.2 Entkalkung und Entwässerung

Die fixierten Kniegelenke wurden aus dem gepuffertem Formalin in Einbettkassetten gelegt und für 48 h in Entkalkungslösung (Osteosoft) überführt. Danach erfolgte eine Entwässerung in einem Entwässerungsautomaten in aufsteigender Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 %, Xylol) und zuletzt eine Überführung in zwei nacheinander geschalteten Paraffinbädern bei 60 °C [208].

5.2.1.3 Paraffinblockherstellung

An einer Paraffinausgießstation wurden die Einbettkassetten mit den darin befindlichen Kniegelenken in vorgewärmte Ausgießformen gelegt und mit 60 °C heißem Paraffin übergossen. Die Ausgießform wurde auf eine Kälteplatte (-20 °C) gestellt, wodurch das Präparat und das umgebende Paraffin leicht erstarren konnten. Mithilfe einer Pinzette konnten so die Kniegelenke parallel zur späteren Schnittfläche positioniert werden, was die Herstellung von Schnittpräparaten in Sagittalebene ermöglichte. Die Ausgießform samt Paraffinblock verblieb auf der Kälteplatte bis das gesamte Paraffin erstarrte. Im Anschluss konnten die Paraffinblöcke aus den Ausgießformen herausgelöst und in Plastikboxen bei RT bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt werden.

5.2.1.4 Herstellung der Gewebeschnitte

Die Schnittflächen der Paraffinblöcke wurden auf eine vorgekühlte Kälteplatte (- 20 °C) gelegt, um den Schneidevorgang am Microtom zu erleichtern und die Schnittpräparate zu

optimieren. Die Kühlung der Schnittflächen wurde während des Schneidens regelmäßig wiederholt. Die Dicke der Schnittpräparate betrug dabei 2 µm [208]. Diese wurden erst zur Faltenminimierung auf ein Streckbad mit Aquadest (36 °C) überführt und anschließend auf beschriftete Objektträger (OT) aufgezogen.

Im Anschluss wurden die OT für ca. 15 min auf einer Streckplatte bei 75 °C belassen. Letzter Schritt diente dazu, dass sich das darauf befindliche Gewebe besser legt, darunter überschüssiges Wasser verdunstet und ein Teil des Paraffins abfließt. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die OT in Präparatekästen aufbewahrt.

5.2.1.5 Theoretische Grundlagen der Immunhistochemie

In der Immunhistochemie (IHC) können die gesuchten Antigene auf histologischen Gewebeschnitten mit spezifischen Antikörpern detektiert werden. Im ersten Schritt bindet dabei ein monoklonaler oder polyklonaler Antikörper (AK) sein passendes Antigen, welches nur auf bestimmten Zellen vorhanden ist. Es entstehen Antigen-Antikörper - Komplexe. Im zweiten Schritt dienen bestimmte Marker der Sichtbarmachung entstandener Komplexe. Als Marker können Enzyme, Fluoreszenzfarbstoffe oder radioaktive Isotope ihre Anwendung finden. Dieser Vorgang entspricht der direkten Immunhistochemie [217].

Die heutzutage eher gebräuchlichere Methode stellt die indirekte Immunhistochemie dar. Hierbei werden meistens Sekundärantikörper zwischengeschaltet, die sich gegen den Primärantikörper richten und je nach Methode mit unterschiedlichen Markern ausgestattet sind. Der Vorteil dabei liegt vor allem in der Signalverstärkung, da mehrere markierte Sekundärantikörper den Primärantikörper binden können [217]. Viele Arten der Durchführung einer indirekten IHC wurden in der Vergangenheit entwickelt, darunter auch die Polymer - Methode. Diese stellt die Grundlage dieser Arbeit dar und wird daher näher erläutert.

5.2.1.6 Polymer - Methode

Im ersten Schritt wird das histologische Gewebe mit einem Primärantikörper inkubiert. In dieser Arbeit handelte es sich dabei um einen polyklonalen Kaninchen - AK, der eine Komplexbildung mit dem gesuchten Antigen auf dem Gewebe einging. Im zweiten Schritt bindet an den Primärantikörper ein Dextran - Polymer - Konjugat. Dieses besteht aus mehreren anti - Kaninchen - AK (Sekundär - AK), welche sich gegen den polyklonalen Kaninchen - AK (Primärantikörper) richten. Die Sekundärantikörper sind

dabei an ein Polysaccharidgerüst gebunden, das zusätzlich mit HRP (Horse - Redish - Peroxidase) - Enzymen bestückt ist (**Abb. 2**). Letztere sind enzymatische Marker, die bei Hinzugabe eines Substrates (hier DAB (3,3 - Diaminobenzidin)), dieses umsetzen und so einen braunen, lichtmikroskopisch sichtbaren Farbniederschlag erzeugen.

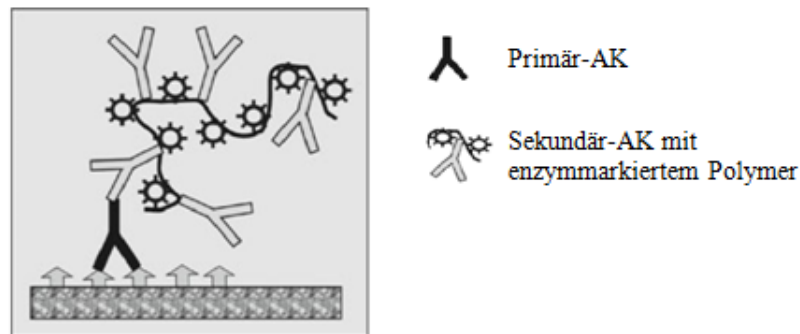


Abb. 2 zeigt eine Variante der indirekten Immunhistochemie, die Polymer - Methode [217]

5.2.1.7 Durchführung der Immunhistochemie

5.2.1.7.1 Vorbereitung

Die vorbereiteten Gewebeschnitte wurden immunhistochemisch auf das Vorkommen der jeweils sechs verschiedenen Antigene untersucht: $\text{TNF}\alpha$, IL - 1β , IL - 6, CD 68, CD 45 und CD 3 [208].

Jeder der sechs Antigene wurde dabei getrennt auf den Schnittpräparaten der PBS-, Metallionen (MI) -, Metallpartikel (MP)- und Polyethylen (PE) - Gruppe getestet. Negativkontrollen von unbehandelten Mäusen stellten dabei den Vergleich zur PBS-Gruppe dar, inwieweit bei letzterer Gruppe der Vorgang der Injektion selbst eine Gewebereaktion hervorruft [208].

Schnittpräparate von Milz, Lunge und Tonsille, welche mit ihren Antigenen immer positiv auf oben genannte AK reagieren, dienten als Positivkontrolle (**Tab. 1**) [208].

Für die anschließende Entparaffinierung wurden die auf Objektträgern befindlichen Schnittpräparate in Färbegondeln für 16 h in einen Wärmeschrank bei 60°C gestellt.

Positivgewebe	Primärantikörper
Milz	TNF α
Lunge	IL - 1 β , IL - 6
Tonsille	CD 68, CD 45, CD 3

Tab. 1 Positivgewebe für spezifische Primärantikörper

5.2.1.7.2 Entparaffinierung und Hitze - induzierte Demaskierung

Die Färbegondeln samt OT wurden in Küvetten in absteigender Alkoholreihe (Xylol 2 x 10 min., 100 % 2 x 10 min, 96 % 5 min, 70 % 5 min, abschließend in Aquadest) entparaffiniert und entwässert. Dieser Schritt war nötig, um Hintergrundfärbungen in der IHC zu vermeiden, die durch Paraffin mitunter ausgelöst werden konnten [218].

Durch die Formalinfixation können manche Antigene in ihrer Struktur derart verändert worden sein, dass AK unter Umständen keine Bindung eingehen können. Um diesem Problem zu begegnen, können diese entweder enzymatisch oder thermisch demaskiert werden [217]. Letzteres wurde gewählt und die Färbegondeln in eine EDTA - Pufferlösung (pH 9) getaucht, welche in einer handelsüblichen Mikrowelle bei 700 Watt 3 x 5min die Schnittpräparate kochte. Im Anschluss kühlten die Schnitte bei RT in der Pufferlösung verbleibend für 20 min aus.

Nach kurzer Lufttrocknung wurde das Gewebe auf den OT mit einem Fettstift (PAP-Pen) umrandet, um ein Auslaufen von Lösungen zu verhindern, die im weiteren Verlauf ihre Anwendung fanden. Nach Trocknung der Fettumrandung wurden die OT erneut in Färbegondeln platziert und für 3 min in einer Küvette mit Waschpufferlösung gewaschen.

5.2.1.7.3 Peroxidase - Block

Die OT wurden aus dem Waschpuffer in eine 3 % H₂O₂ - Lösung für 4 min überführt. Das Wasserstoffperoxid blockiert endogene Peroxidasen, die manche Zellen enthalten. Diese hätten zusätzlich zu den HRP - Enzymen das DAB umgesetzt, was zu falsch positiven Farbniederschlägen geführt hätte [217]. Nach dem Peroxidase - Block wurde weiter für 3 x 2 min im Waschpuffer gewaschen.

5.2.1.7.4 Primär - Antikörper

Die Antikörperansätze (1 : 100) wurden vorweg auf eine Endkonzentration ausgetestet, um Überfärbungen oder zu schwache Färbungen auf den Gewebeschnitten zu vermeiden.

Tab. 2 zeigt die jeweiligen Verdünnungen der dann verwendeten Primär -AK - Konzentrationen für den ersten Inkubationsschritt auf dem Gewebe:

Primärantikörper	benötigte Verdünnung
TNF α - AK	1 : 200
IL - 1 β - AK	1 : 150
IL - 6 - AK	1 : 200
CD 68 - AK	1 : 100
CD 45 - AK	1 : 400
CD 3 - AK	1 : 100

Tab. 2 Verdünnung der Primärantikörper, Endkonzentrationen [208]

Um das Austrocknen der Präparate zu verhindern, wurden die OT zügig vom Waschpuffer in eine feuchte Kammer platziert und mit 180 μ l Primärantikörper pro Präparat für eine Stunde bei RT inkubiert. Danach wurden diese in Färbegondeln gestellt und im Waschpuffer für 3 x 2 min gewaschen.

5.2.1.7.5 Sekundär - Antikörper

Der Sekundär - AK war als Dextran - Polymer - Konjugat mit HRP - Enzymen bereits in fertiger Lösung Bestandteil eines Kit - Systems, das ohne weitere Aufbereitung gleich angewandt werden konnte.

Die Schnittpräparate wurden mit jeweils 50 - 150 μ l des Sekundärantikörpers für weitere 15 min in der Feuchtkammer inkubiert. Anschließend im Waschpuffer für 3 x 2 min gewaschen.

5.2.1.7.6 Chromogen und Gegenfärbung

Danach erfolgte die Inkubation mit 50 - 100 μ l des Chromogens DAB (3,3 - Diaminobenzidin) pro Schnittpräparat für weitere 5 min in der Feuchtkammer. Die HRP - Enzyme setzten dabei das DAB in einen braunen Farbniederschlag um. Im letzten darauffolgenden Waschvorgang wurden die Präparate einmalig für 3 min gewaschen und dann in Aquadest überführt.

Zuletzt wurde für 30 sec mit Haematoxinin gegengefärbt und die Präparate für 10 min unter fließendes, lauwarmes Leitungswasser gestellt.

5.2.1.7.7 Entwässerung und Eindeckung

In aufsteigender Alkoholreihe (70% 5 min, 96% 5 min, 100% 3 x 5 min, Xylol 2 x 10 min) wurden die Schnittpräparate entwässert, bevor diese mit Eukitt und Deckgläschen eingedeckt werden konnten. Im Anschluss erfolgte die Trocknung der OT im Trockenschrank bei 65 °C für mind. 10 min.

Die fertigen OT konnten nun lichtmikroskopisch ausgewertet werden. Die Aufbewahrung erfolgte bei RT in Präparatekästen.

5.3 Auswertung

5.3.1 Histologische Auswertung

Die Auswertung der Schnittpräparate erfolgte in 200 - facher Vergrößerung mittels eines vollautomatisierten, digitalen Durchlicht - Mikroskops (M8, Precipoint).

Ausgewertet wurde dabei das Synovialgewebe der sowohl linken murinen Kniegelenke (Z.n. Injektion intraartikulär mit jeweiliger Suspension von PBS, Metallionen (MI), Metall (MP) - oder Polyethylenpartikel (PE) und anschließender 7 - tägiger Inkubation) als auch der rechten Kniegelenke. Hierbei wurde die Synovialmembran auf das Vorkommen von TNF α -, IL - 6 -, IL - 1 β -, CD 68 -, CD 45 -, CD 3 - positiven Zellen untersucht [208]. Kniegelenke unbehandelter Tiere dienten jeweils als Negativkontrolle. Zellen wurden dabei als positiv gewertet, welche eine sichtbare Braunfärbung im Zytoplasma zeigten und deren Zellkern mit Hämatoxylin gegengefärbt war. In die Bewertung gingen nur positive Zellen der Synovialmembran ein. Diese wurde in Gesichtsfelder bei einer 200 - fachen Vergrößerung eingeteilt und jede positive Zelle einzeln gezählt [208].

5.3.2 Statistische Auswertung

Die gewonnenen Daten der immunhistochemischen Auswertung wurden mit IBM SPSS® (Statistical Package for the Social Sciences) Statistics - Programm (Version 24.0) ausgewertet. Die Statistik wurde dabei mit dem nicht - parametrischen Kruskal -Wallis -

Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Dabei galten p - Werte unter 0,05 als statistisch signifikant und wurden durch die Bonferroni - Korrektur angepasst [208].

5.4 Material für Gewebepvorbereitung und Immunhistochemie

5.4.1 Geräte

Gerät	Firma
Paraffin - Streckbad	Gesellschaft für Labortechnik Burgwedel, Deutschland
Paraffinausgießstation Leica EG 1160	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Rotationsmikrotom Leica RM 2255	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Heizplatte	Medax GmbH & Co.KG Büchenbach, Deutschland
Wärmeschränk	Köttermann GmbH & Co KG Uetze/Hänigsen, Deutschland
Entwässerungsautomat Hypercenter XP	Thermo Shandon GmbH Frankfurt, Deutschland
Gefrierschränk -20°C Liebherr Premium No Frost	Liebherr-International Deutschland GmbH Biberach an der Riß, Deutschland
Kühlschränk 4°C Liebherr Comfort	Liebherr-International Deutschland GmbH Biberach an der Riß, Deutschland
Mikrowelle	Siemens AG München, Deutschland
Mikroskop M8	PreciPoint, Freising, Deutschland
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co KG Heilbronn, Deutschland
Mikroliterpipette Transferpette S, typ variabel (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	BRAND GmbH & Co KG Wertheim, Deutschland

Tab. 3 Geräteliste für Gewebepvorbereitung und Immunhistochemie

5.4.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
Einbettkassetten für Biopsien	Carl Roth GmbH & Co Karlsruhe, Deutschland
Messzylinder 1000 ml, 500 ml Duran	BRAND GmbH & Co KG Wertheim, Deutschland
Manuelle Färbestation inkl. Färbe-Rack	Diapath S.P.A.Martinengo BG, Italien
Färbeküvetten	Wagner & Munz GmbH München, Deutschland
Färbekammern Stain Tray	Carl Roth GmbH & Co Karlsruhe, Deutschland
Microtom Blade A35/R35/N35 HR-pfm	Feather Safety Razor Co. Ltd. Osaka, Japan
Objektträger Superfrost Plus/UltraPlus	Menzel GmbH & Co KG Braunschweig, Deutschland
Deckgläser 24 x 32 mm / 24 x 50 mm	Menzel GmbH & Co KG Braunschweig, Deutschland
Pap Pen	DCS Innovative Diagnostik-Systeme Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson International B.V. Limburg-Offenheim, Deutschland
Serologische Pipette Costar Stripette 2 ml, 5 ml, 25 ml, 50 ml	Corning Inc. New York, USA
Reaktionsgefäße Eppendorf Tubes 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland

Zentrifugenröhrchen 15 ml	TTP Techno Plastic Products AG Trasadingen, Schweiz
Münchner Mappen	Wagner & Munz GmbH München, Deutschland
Präparatekästen	neoLab für mein Labor Heidelberg, Deutschland
Mobile Cooling System	pfm medical ag Köln, Deutschland

Tab. 4 Verbrauchsmaterialien Gewebepvorbereitung und Immunhistochemie

5.4.3 Reagenzien

Reagenz	Firma
Ethanol 70% vollständig vergällt mit Methylketon	Apotheke Innenstadt Universität München, Deutschland
Ethanol 96% vollständig vergällt mit Methylketon	Apotheke Innenstadt Universität München, Deutschland
Ethanol 99% vergällt mit 1% Petrolether	SAV Liquid Production GmbH Flintsbach am Inn, Deutschland
Neutral gepufferte Formaldehydlösung 4%	Microcos GmbH Garching, Deutschland
Xylol reinst > 98%	SAV Liquid Production GmbH Flintsbach am Inn, Deutschland
HistoSAV	SAV Liquid Production GmbH Flintsbach am Inn, Deutschland
PBS-Puffer pH 7,4 (10x konzentriert)	Apotheke Innenstadt Universität München, Deutschland

Paraplast	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Brij L23 solution	Sigma Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Eukitt	O. Kindler GmbH, Freiburg, Deutschland
Mayer's Hematoxylin Solution	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Osteosoft	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
DCS Detection Line SUPERVision 2 Single Species HRP-Polymer Kaninchen	DCS Innovative Diagnostik-Systeme Hamburg, Deutschland
DCS ChromoLine DAB-2 Komponenten/Chromogen-Kit	DCS Innovative Diagnostik-Systeme Hamburg, Deutschland
DCS LabLine Antikörper- Verdünnungspuffer	DCS Innovative Diagnostik-Systeme Hamburg, Deutschland
DCS LabLine EDTA-Puffer pH9 (10x)	DCS Innovative Diagnostik-Systeme Hamburg, Deutschland

Tab. 5 Reagenzien für Gewebepreparation und Immunhistochemie

5.4.4 Antikörper - Konzentrate

Material	Firma
Anti - mouse polyklonaler Rabbit -TNF α - Antikörper 100 μ g / 200 μ l	Biorbyt Ltd., United Kingdom Bestellnr.: orb18076
Anti - mouse polyklonaler Rabbit - IL - 6 -Antikörper 100 μ g / 200 μ l	Biorbyt Ltd., United Kingdom Bestellnr.: orb6210

Anti - mouse polyklonaler Rabitt - IL - 1β - Antikörper 100µg / 200µl	Biorbyt Ltd., United Kingdom Bestellnr.: orb10903
Anti - mouse polyklonaler Rabitt - CD 68 - Antikörper 100µg / 200µl	Biorbyt Ltd., United Kingdom Bestellnr.: orb197999
Anti - mouse polyklonaler Rabitt - CD 45 - Antikörper 100µg / 200µl	Biorbyt Ltd., United Kingdom Bestellnr.: orb10328
Anti - mouse polyklonaler Rabitt - CD 3 - Antikörper 100µg / 200µl	Biorbyt Ltd., United Kingdom Bestellnr.: orb10313

Tab. 6 Antikörper für Immunhistochemie

5.4.5 Zubereitete Puffer und Lösungen

PBS - Puffer verdünnt:	1 Liter PBS - Puffer (10 x konzentriert) + 9 Liter Aquadest
Wasserstoffperoxid 3%:	25 ml H ₂ O ₂ 30 % + 225 ml Aquadest
PBS - Brij (Waschpuffer):	5 Liter verdünnter PBS - Puffer (s.o.) + 5 ml Brij
EDTA - Puffer pH 9,0:	30 ml EDTA pH 9 (10x konzentriert) + 270 ml Aquadest
Chromogenansatz:	1000 µl DAB - Substratpuffer + 1 gtt DAB - Konzentrat
Antikörperansatz 1:100:	100 µl des jeweiligen AK + 9,9 ml Antikörperverdünnungspuffer

Tab. 7 Zubereitete Puffer und Lösungen zur Durchführung der Immunhistochemie

6 Ergebnisse

Die immunhistochemische Anfärbung der histologischen Schnitte der PE - Gruppe zeigte sich trotz mehrfacher Wiederholungen misslungen und war somit nicht auswertbar. Sie fließen nicht in die Ergebnisse mit ein.

Die Ergebnisse dieser Arbeit inklusive Teile der graphischen Darstellungen sowie Teile des Bildmaterials wurden vorab publiziert (siehe Cheng X., Dirmeier S.C. et al., Biological Reactions to Metal Particles and Ions in the Synovial Layer of Mice. Materials (Basel), 2020 [208]). Das Copyright besitzen hierbei die Autoren.

6.1 Ergebnisse der Entzündungsreaktion im linken Kniegelenk

6.1.1 TNF α - positive Zellen im Synovialgewebe der linken Kniegelenke

Die Analyse des Synovialgewebes der linken murinen Kniegelenke (Z.n. Injektion von PBS, Metallionen, Metall - oder Polyethylenpartikeln mit anschließender 7 tägiger Inkubation) ergab in der PBS - Gruppe ($n_{\text{PBS}} = 10$) einen Median von 3,18 positive Zellen/Gesichtsfeld (Min. 0,00; Max. 4,50 positive Zellen/Gesichtsfeld). Verglichen hierzu, zeigte sich in der MI - Gruppe ($n_{\text{MI}} = 10$) ein Median von 15,65 positiven Zellen/Gesichtsfeld (Min. 4,83; Max. 45,50 positive Zellen/Gesichtsfeld). Die MP - Gruppe ($n_{\text{MP}} = 10$) ergab hinsichtlich der TNF α - Überexpression einen deutlich erhöhten Median von 139,63 positiven Zellen/Gesichtsfeld (Min. 67,33; Max. 500,86 positive Zellen/Gesichtsfeld). Im direkten Vergleich lag die NegKo - Gruppe ($(n_{\text{NegKo}} = 5)$; unbehandelte Tiere, keine Injektion intraartikulär) bei einem Median von 1,60 positiven Zellen/Gesichtsfeld (Min. 0,67; Max. 3,56 positive Zellen/Gesichtsfeld).

Die MP - Gruppe zeigte somit eine deutlich statistisch signifikante Überexpression von TNF α - positiven Zellen verglichen zur NegKo - ($p = 0,000$) und PBS - Gruppe ($p = 0,000$) [208]. Zwischen der NegKo - und PBS - Gruppe lag kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 1,0$). Hinsichtlich der MI - Gruppe konnten ebenso keine statistisch signifikanter Unterschied im direkten Vergleich zur NegKo - ($p = 0,088$), PBS - ($p = 0,056$) [208] und MP - Gruppe ($p = 0,174$) festgestellt werden. **Abb 3.** veranschaulicht hierbei anhand von Boxplots die TNF α - Überexpression im Gruppenvergleich.

Abb. 3 (basierend auf Cheng X., Dirmeier S.C. et al., 2020 [208]) zeigt die statistisch signifikante Überexpression von TNF α - positiven Zellen der MP - Gruppe im linken murinen Synovialgewebe gegenüber der PBS - und NegKo - Gruppe ($p < 0,05$) [208].

(* $p < 0,05$)

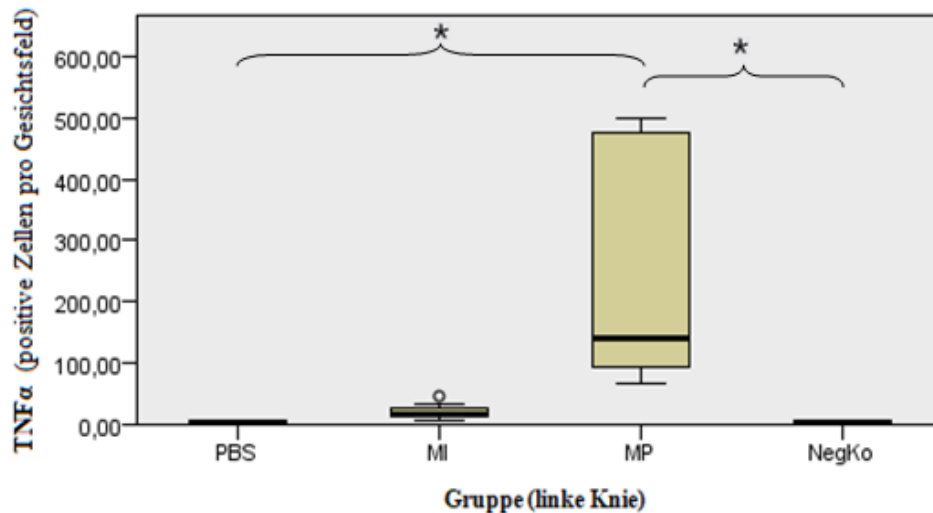


Abb. 4 - 8 zeigen jeweils das Synovialgewebe der linken murinen Kniegelenke der einzelnen Versuchsgruppen (PBS -, MP -, MI -, PE - Gruppe) sowie der NegKo - Gruppe in immunhistochemischer Anfärbung mit TNF α - Antikörpern [208]. In **Abb. 7** ist ein Ausschnitt des deutlich verdickten Synovialgewebes mit zahlreichen TNF α - positiven Zellen zu sehen als Reaktion auf die intraartikuläre MP - Injektion mit 7 tägiger Inkubation [208]. Die Anfärbung der PE - Gruppe (**Abb. 8**) zeigt sich misslungen. Vergrößerung: 200 fach.

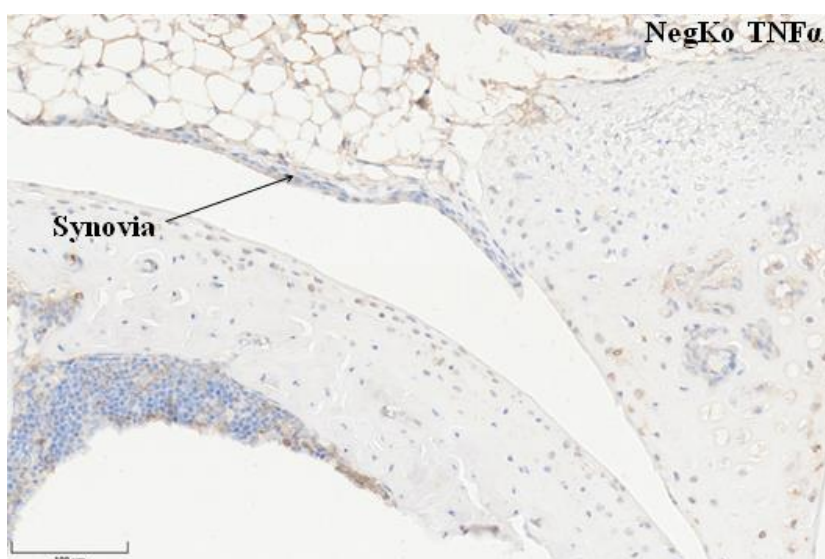


Abb. 4 (basierend auf Cheng X., Dirmeier S.C. et. al, 2020 [208])

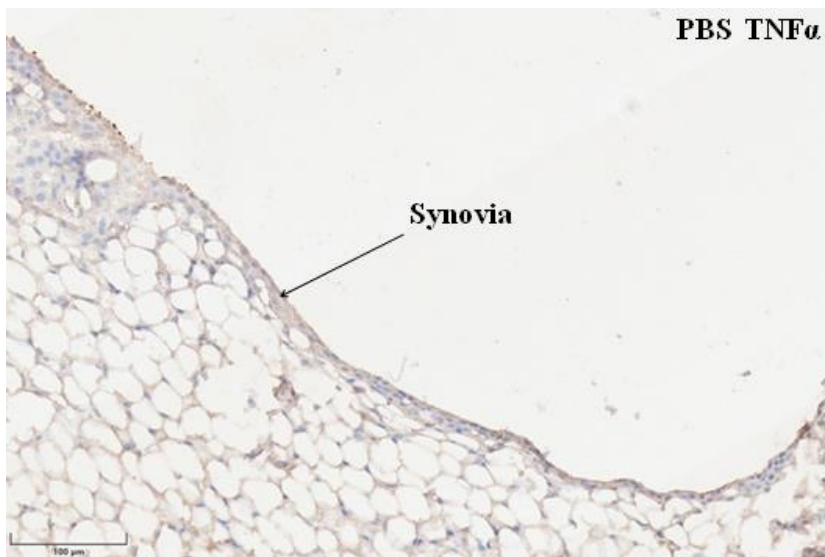


Abb. 5 (basierend auf Cheng X., Dirmeier S.C. et al., 2020 [208])



Abb. 6 (basierend auf Cheng X., Dirmeier S.C. et al., 2020 [208])

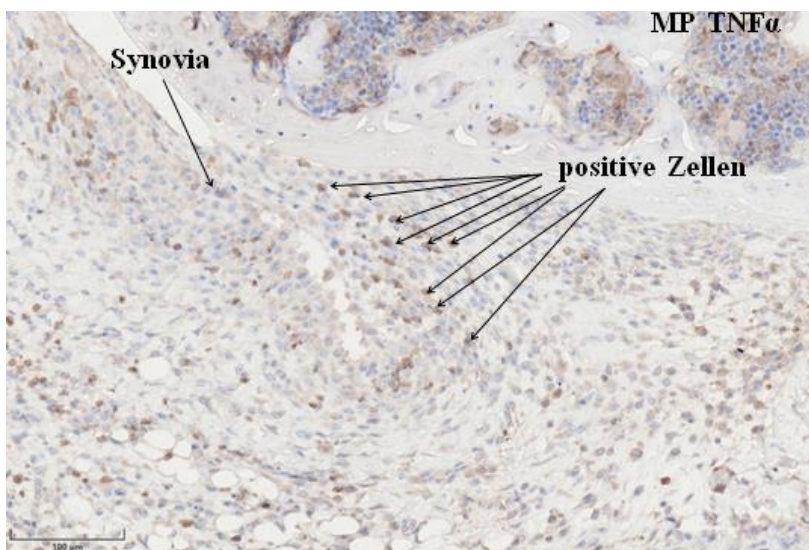


Abb. 7 (basierend auf Cheng X., Dirmeier S.C. et al., 2020 [208])

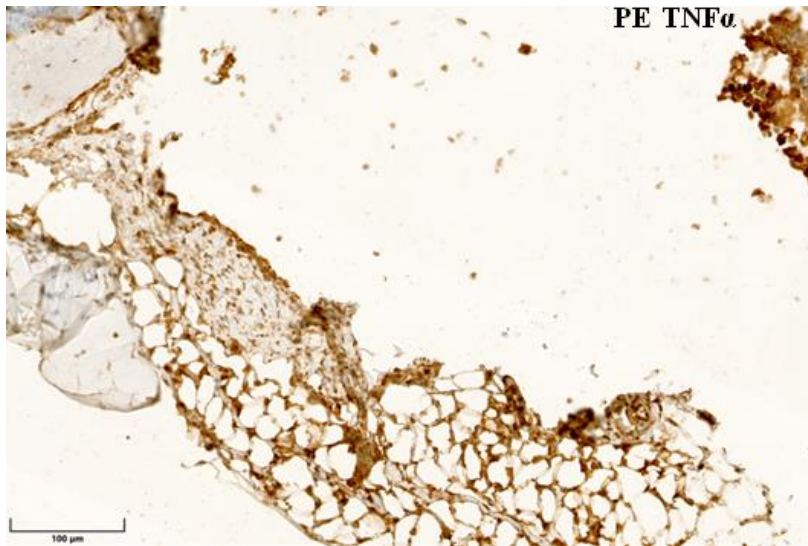


Abb. 8

6.1.2 IL - 6 - positive Zellen im Synovialgewebe der linken Kniegelenke

In der Analyse des Synovialgewebes der linken murinen Kniegelenke (Z.n. Injektion von PBS, Metallionen, Metall- oder Polyethylenpartikeln mit anschließender 7 tägiger Inkubation) zeigten sich innerhalb der PBS - Gruppe ($n_{\text{PBS}} = 10$) im Median 5,51 positive Zellen/Gesichtsfeld (Min. 0,75; Max. 9,40 positive Zellen/Gesichtsfeld). Im Vergleich hierzu ergab sich in der MI - Gruppe ($n_{\text{MI}} = 10$) ein Median von 13,29 positiven Zellen/Gesichtsfeld (Min. 5,40; Max. 19,00 positive Zellen/Gesichtsfeld). Die MP - Gruppe ($n_{\text{MP}} = 10$) lag hinsichtlich der IL - 6 - Expression deutlich erhöht bei einem Median von 69,73 positiven Zellen/Gesichtsfeld (Min. 48,00; Max. 294,50 positive Zellen/Gesichtsfeld). Im direkten Vergleich dazu, wies die NegKo - Gruppe ($n_{\text{NegKo}} = 5$); unbehandelte Tiere, keine Injektion intraartikulär) einen Median von 6,25 positiven Zellen/Gesichtsfeld auf (Min. 3,00; Max. 11,00 positive Zellen/Gesichtsfeld).

Die MP - Gruppe zeigte somit eine deutlich statistisch signifikante Überexpression von IL - 6 - positiven Zellen im Vergleich zur NegKo - ($p = 0,002$) und PBS - Gruppe ($p = 0,000$) [208]. Zwischen der NegKo - und der PBS - Gruppe lag kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 1,0$). Hinsichtlich der MI - Gruppe konnte ebenso kein statistisch signifikanter Unterschied im direkten Vergleich zur NegKo - ($p = 0,835$), PBS - ($p = 0,124$) [208] und MP - Gruppe ($p = 0,068$) festgestellt werden. **Abb. 9** veranschaulicht hierbei anhand von Boxplots die IL - 6 - Überexpression im Gruppenvergleich.

Abb. 9 (basierend auf Cheng X., Dirmeier S.C. et al., 2020 [208]) zeigt die statistisch signifikante Überexpression von IL - 6 - positiven Zellen der MP - Gruppe im linken murinen Synovialgewebe gegenüber der PBS - und der NegKo - Gruppe ($p < 0,05$) [208]. (* $p < 0,05$)

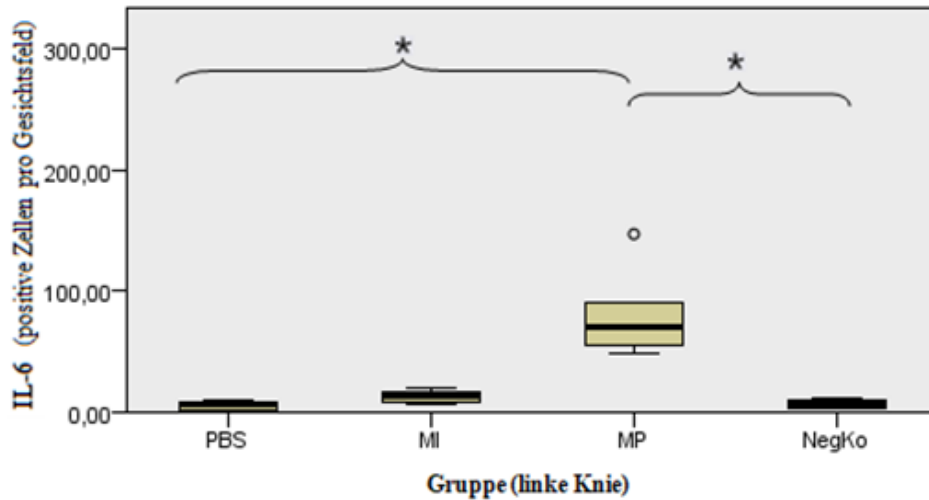


Abb. 10 - 13 zeigen jeweils das Synovialgewebe der linken murinen Kniegelenke der einzelnen Versuchsgruppen (PBS -, MP -, MI - Gruppe) sowie der NegKo - Gruppe in immunhistochemischer Anfärbung mit IL - 6 - Antikörpern. In **Abb. 13** ist ein Ausschnitt der deutlich verdickten Synovia mit zahlreichen IL - 6 - positiven Zellen zu sehen als Reaktion auf die intraartikuläre MP - Injektion mit 7 tägiger Inkubation. Vereinzelt finden sich auch in der MI - Gruppe positive Zellen. Vergrößerung: 200 fach.

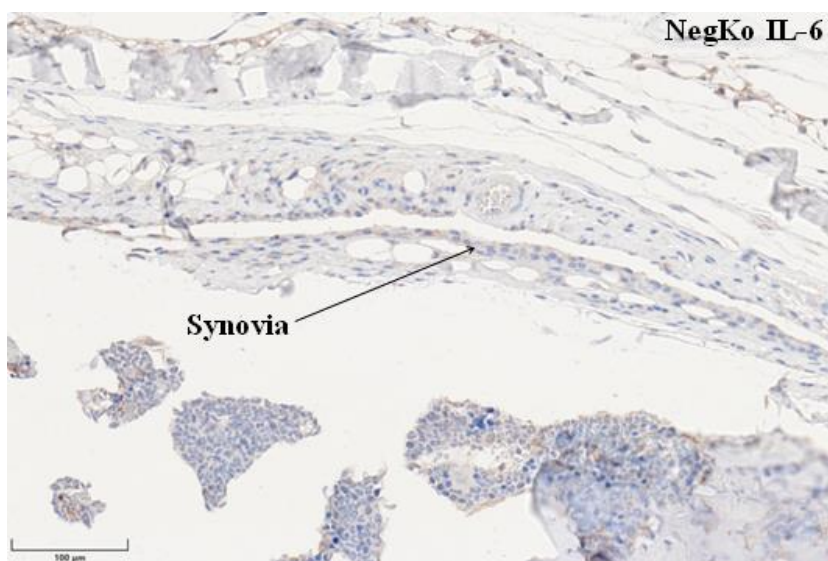


Abb. 10

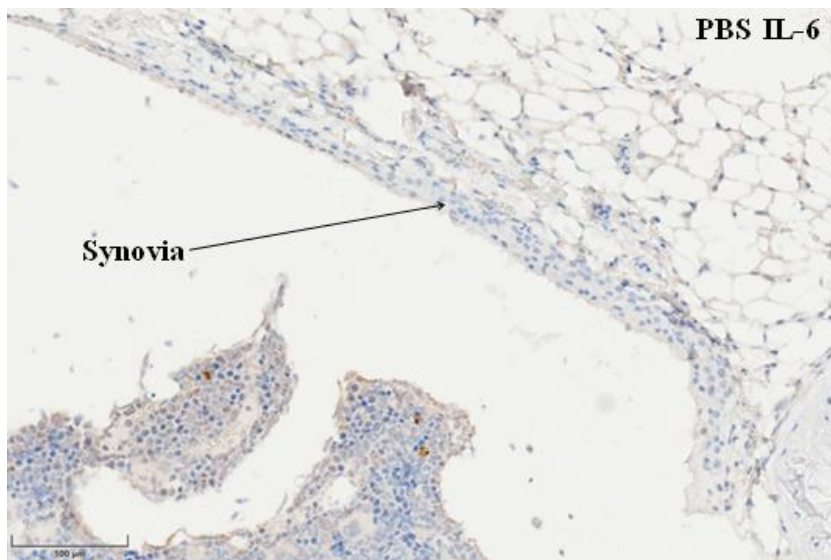


Abb. 11



Abb. 12

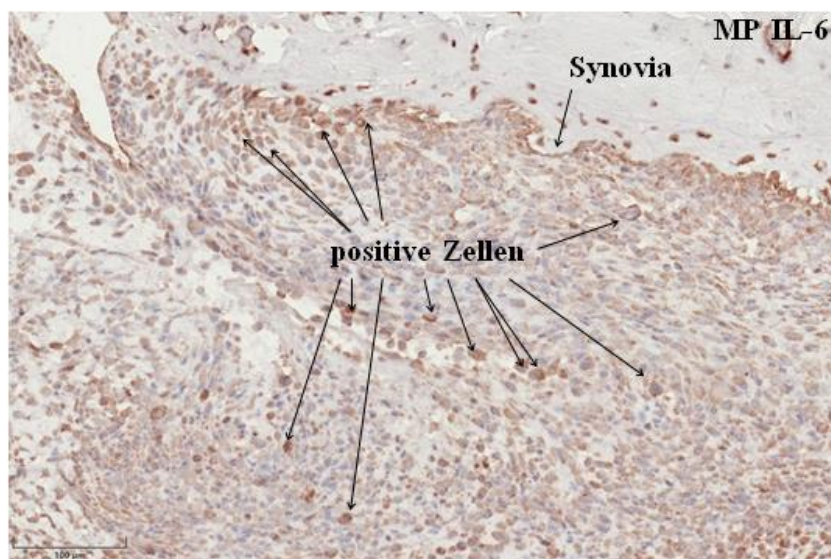


Abb. 13

6.1.3 IL - 1 β - positive Zellen im Synovialgewebe der linken Kniegelenke

In der Analyse des Synovialgewebes der linken murinen Kniegelenke (Z.n. Injektion von PBS, Metallionen, Metall - oder Polyethylenpartikeln mit anschließender 7 tägiger Inkubation) zeigte sich innerhalb der PBS - Gruppe ($n_{\text{PBS}} = 10$) ein Median von 1,00 positive Zellen/Gesichtsfeld (Min. 0,00; Max. 3,33 positive Zellen/Gesichtsfeld). Im Vergleich hierzu ergab sich bei der MI - Gruppe ($n_{\text{MI}} = 10$) ein Median von 3,32 positiven Zellen/Gesichtsfeld (Min. 0,50; Max. 8,00 positive Zellen/Gesichtsfeld). Die MP - Gruppe ($n_{\text{MP}} = 10$) zeigte eine IL - 1 β - Überexpression mit einem Median von 17,66 positiven Zellen/Gesichtsfeld (Min. 4,71; Max. 203,00 positiven Zellen/Gesichtsfeld). Im direkten Vergleich dazu lag die NegKo - Gruppe ($n_{\text{NegKo}} = 5$); unbehandelte Tiere, keine Injektion intraartikulär) bei einem Median von nur 0,40 positiven Zellen/Gesichtsfeld (Min. 0,25; Max. 3,33 positive Zellen/Gesichtsfeld).

Die MP - Gruppe zeigte somit eine statistisch signifikante Überexpression von IL - 1 β - positiven Zellen gegenüber der PBS - Gruppe ($p = 0,000$) [208]. Die MI - Gruppe wies keinen statistisch signifikanten Unterschied gegenüber der NegKo - ($p = 0,414$), PBS - ($p = 0,420$) [208] und MP - Gruppe ($p = 0,082$) auf. **Abb. 14** veranschaulicht hierbei anhand von Boxplots die IL - 1 β - Überexpression im Gruppenvergleich.

Abb. 14 (basierend auf Cheng X., Dirmeier S.C. et al., 2020 [208]) zeigt die statistisch signifikante Überexpression von IL - 1 β - positiven Zellen der MP - Gruppe im linken murinen Synovialgewebe gegenüber der PBS - und der NegKo - Gruppe ($p < 0,05$) [208]. (* $p < 0,05$)

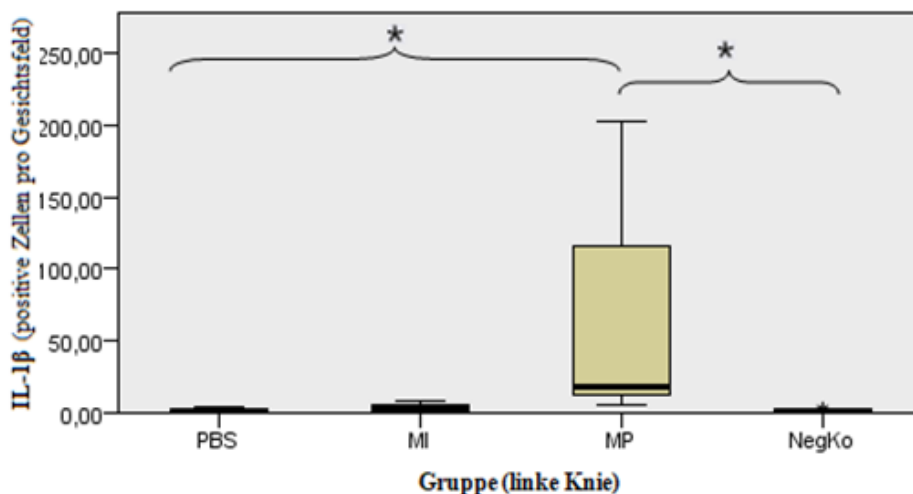


Abb. 15 - 18 zeigen jeweils das Synovialgewebe der linken murinen Kniegelenke der einzelnen Versuchsgruppen (PBS-, MP-, MI - Gruppe) sowie der NegKo - Gruppe in immunhistochemischer Anfärbung mit IL - 1 β - Antikörpern. In **Abb. 18** ist ein Ausschnitt der deutlich verdickten Synovia mit zahlreichen IL - 1 β - positiven Zellen zu sehen als Reaktion auf die intraartikuläre MP - Injektion mit 7 tägiger Inkubation. Vereinzelt finden sich auch in der MI - Gruppe positive Zellen. Vergrößerung: 200 fach.

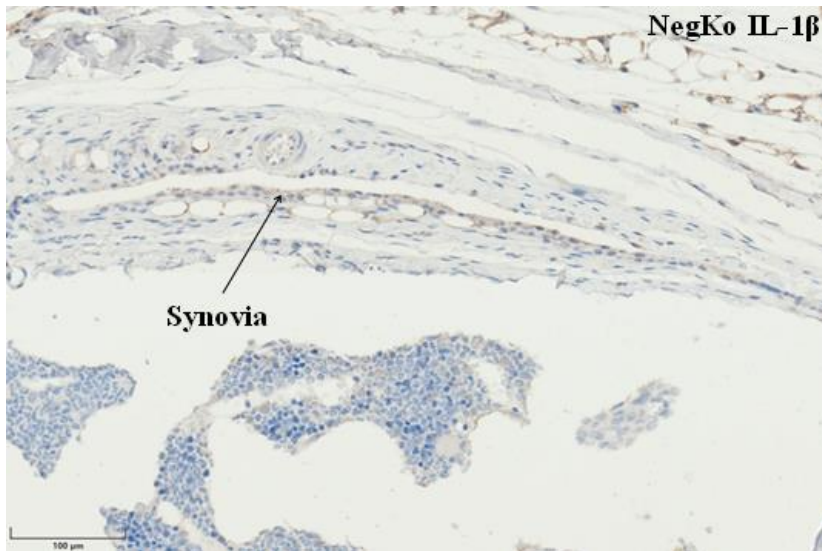


Abb. 15

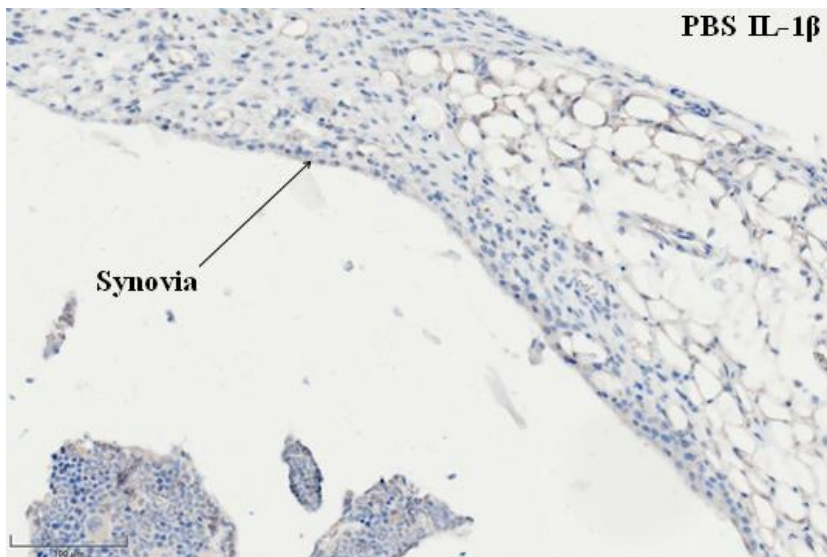


Abb. 16

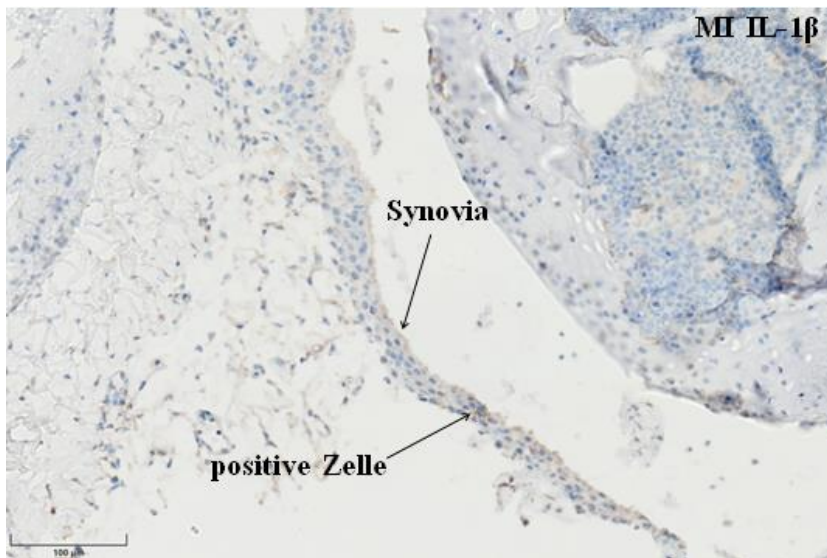


Abb. 17

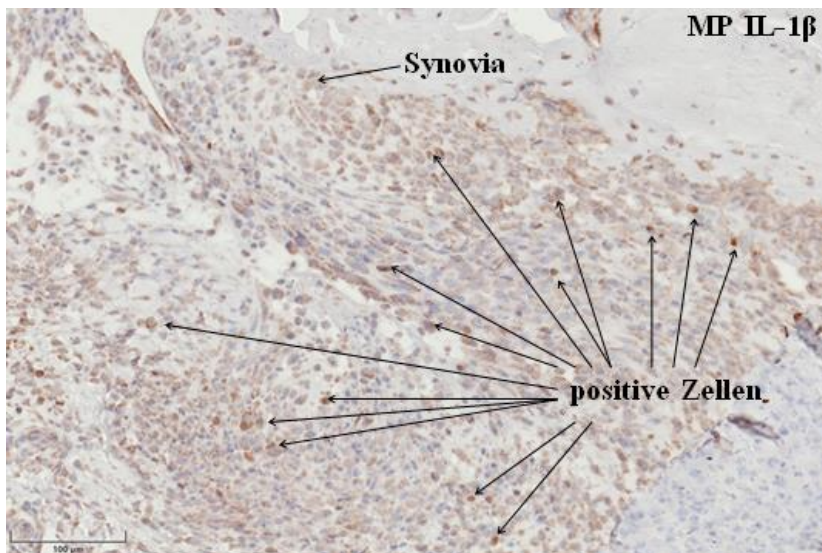


Abb. 18

6.1.4 CD 68 - positive Zellen im Synovialgewebe der linken Kniegelenke

In der Analyse der Synovialgewebe der linken murinen Kniegelenke (Z.n. Injektion von PBS, Metallionen, Metall- oder Polyethylenpartikeln mit anschließender 7 tägiger Inkubation) zeigte sich innerhalb der PBS - Gruppe ($n_{\text{PBS}} = 10$) ein Median von 14,64 positive Zellen/Gesichtsfeld (Min. 3,00; Max. 32,00 positive Zellen/Gesichtsfeld). Im Vergleich hierzu ergab sich bei der MI - Gruppe ($n_{\text{MI}} = 10$) ein Median von 22,05 positive Zellen/Gesichtsfeld (Min. 6,60; Max. 35,29 positive Zellen/Gesichtsfeld). Die MP - Gruppe ($n_{\text{MP}} = 10$) zeigte hinsichtlich der CD 68 - Expression einen deutlich erhöhten Median von 159,80 positiven Zellen/Gesichtsfeld (Min. 65,60; Max. 387,11 positive Zellen/Gesichtsfeld). Im direkten Vergleich dazu lag die NegKo - Gruppe

($n_{\text{NegKo}} = 5$); unbehandelte Tiere, keine Injektion intraartikulär) bei einem Median von 15,33 positiven Zellen/Gesichtsfeld (Min. 5,83; Max. 34,67 positive Zellen/Gesichtsfeld).

Die MP - Gruppe zeigte somit eine deutlich statistisch signifikante Überexpression von CD 68 - positiven Zellen verglichen zur NegKo - ($p = 0,005$), PBS - ($p = 0,000$) und MI - Gruppe ($p = 0,004$) [208]. Die MI - Gruppe wies keinen statistisch signifikanten Unterschied gegenüber der NegKo - ($p = 1,0$) und PBS - Gruppe ($p = 1,0$) auf [208]. **Abb. 19** veranschaulicht hierbei anhand von Boxplots die CD 68 - Überexpression im Gruppenvergleich.

Abb. 19 (basierend auf Cheng X., Dirmeier S.C. et al., 2020 [208]) zeigt die statistisch signifikante Überexpression von CD 68 - positiven Zellen der MP - Gruppe der linken murinen Synovialgewebe gegenüber der PBS -, NegKo - und MI - Gruppe ($p < 0,05$) [208].

(* $p < 0,05$)

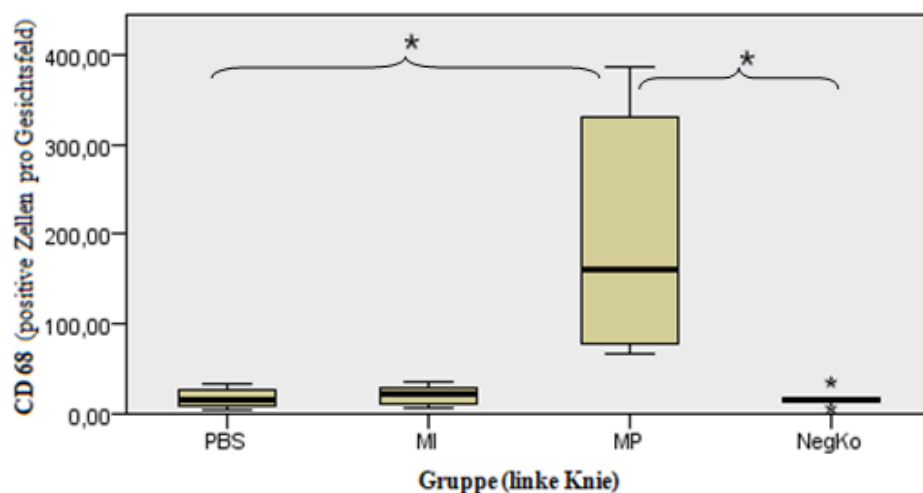


Abb. 20 - 23 zeigen jeweils das Synovialgewebe der linken murinen Kniegelenke der einzelnen Versuchsgruppen (PBS-, MP-, MI - Gruppe) sowie der NegKo - Gruppe in immunhistochemischer Anfärbung mit CD 68 - Antikörpern. In **Abb. 23** ist ein Ausschnitt der deutlich verdickten Synovia mit zahlreichen CD 68 - positiven Zellen zu sehen als Reaktion auf die intraartikuläre MP - Injektion mit 7 tägiger Inkubation. Vereinzelt finden sich auch in der MI - Gruppe positive Zellen. Vergrößerung: 200 fach.

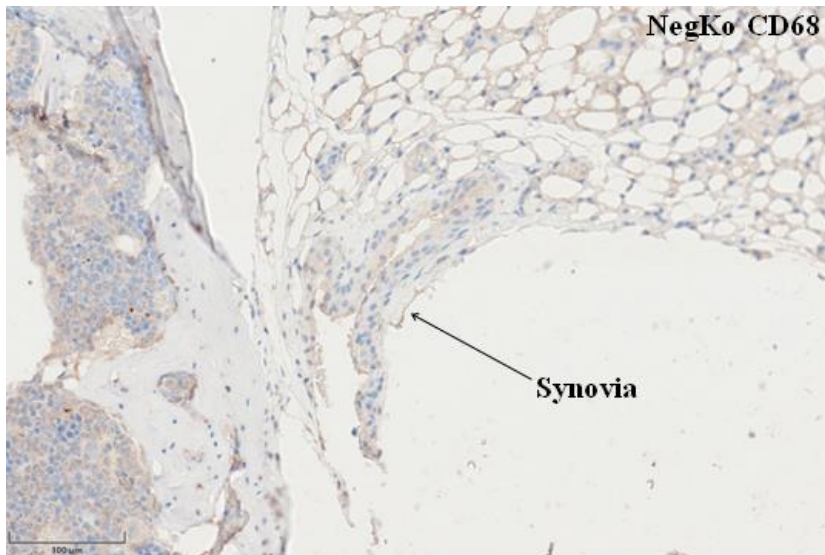


Abb. 20

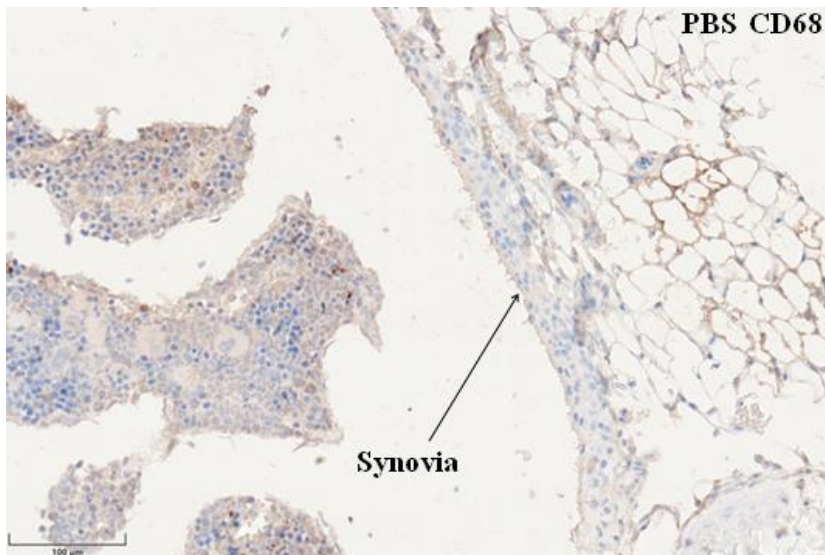


Abb. 21

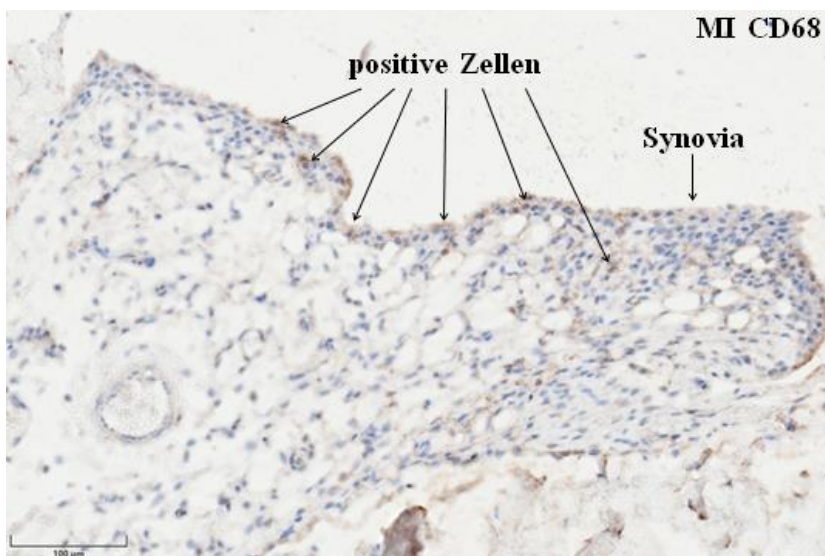


Abb. 22

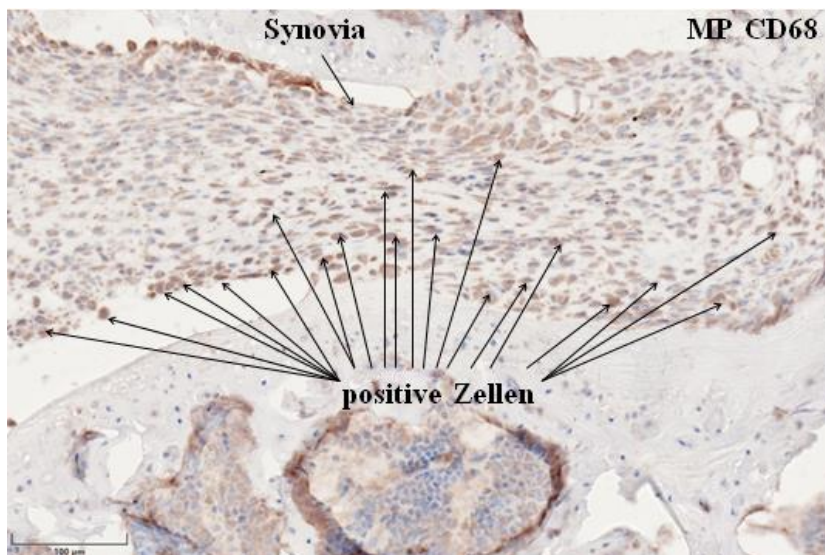


Abb. 23

6.1.5 CD 45 - positive Zellen im Synovialgewebe der linken Kniegelenke

In der Analyse des Synovialgewebes der linken murinen Kniegelenke zeigte sich innerhalb der PBS - Gruppe ($n_{\text{PBS}} = 10$) ein Median von 4,71 $\frac{\text{positive Zellen}}{\text{Gesichtsfeld}}$ (Min. 0,50; Max. 8,25 $\frac{\text{positive Zellen}}{\text{Gesichtsfeld}}$). Im Vergleich hierzu ergab sich in der MI - Gruppe ($n_{\text{MI}} = 10$) ein erhöhter Median von 30,25 $\frac{\text{positiven Zellen}}{\text{Gesichtsfeld}}$ (Min. 22,50; Max. 47,60 $\frac{\text{positive Zellen}}{\text{Gesichtsfeld}}$). Der Median der MP - Gruppe ($n_{\text{MP}} = 10$) lag hinsichtlich der CD 45 - Expression deutlich erhöht bei 101,53 $\frac{\text{positiven Zellen}}{\text{Gesichtsfeld}}$ (Min. 12,40; Max. 297,50 $\frac{\text{positiven Zellen}}{\text{Gesichtsfeld}}$). Die NegKo - Gruppe ($n_{\text{NegKo}} = 5$) wies hierbei einen Median von nur 3,10 $\frac{\text{positiven Zellen}}{\text{Gesichtsfeld}}$ (Min. 0,50; Max. 5,50 $\frac{\text{positive Zellen}}{\text{Gesichtsfeld}}$) auf.

Die MP - Gruppe präsentiert somit eine statistisch signifikante Überexpression von CD 45 - positiven Zellen verglichen zur NegKo - ($p = 0,000$) und PBS - Gruppe ($p = 0,000$) [208]. Die MI - Gruppe wies gegenüber der NegKo - ($p = 0,010$) und PBS - Gruppe ($p = 0,017$) ebenso eine statistische Signifikanz auf [208].

Zwischen der NegKo - und PBS - Gruppe wie auch der MI - gegenüber der MP - Gruppe gab es keinen signifikanten Unterschied (jeweils $p = 1,0$) [208]. **Abb. 24** veranschaulicht hierbei anhand von Boxplots die CD 45 - Überexpression im Gruppenvergleich.

Abb. 24 (basierend auf Cheng X., Dirmeier S.C. et al., 2020 [208]) zeigt die statistisch signifikante Überexpression von CD 45 - positiven Zellen der MP - Gruppe im linken murinen Synovialgewebe gegenüber der PBS - und NegKo - Gruppe ($p < 0,05$) [208], sowie der MI - gegenüber der PBS - Gruppe ($p < 0,05$) [208].

(* $p < 0,05$)

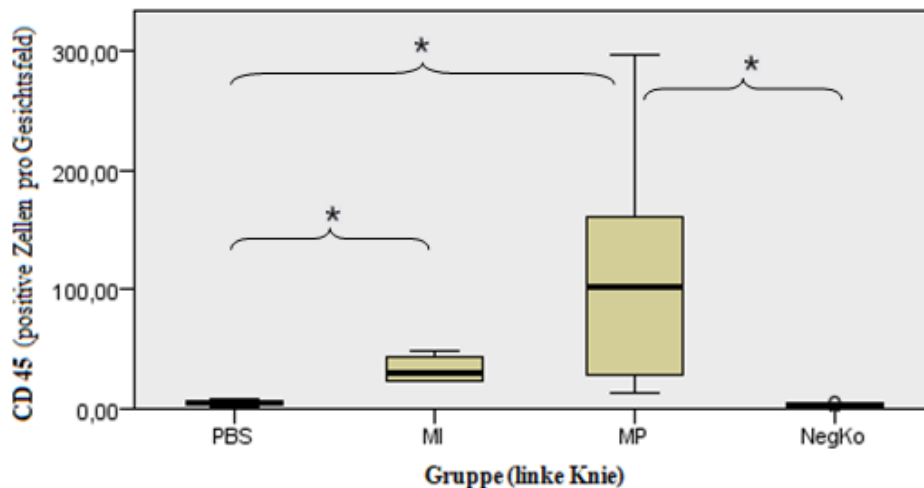


Abb. 25 - 28 zeigen jeweils das Synovialgewebe der linken murinen Kniegelenke der einzelnen Versuchsgruppen (PBS-, MP-, MI - Gruppe) sowie der NegKo - Gruppe in immunhistochemischer Anfärbung mit CD 45 - Antikörpern. In **Abb. 28** ist ein Ausschnitt der deutlich verdickten Synovia mit zahlreichen CD 45 - positiven Zellen zu sehen als Reaktion auf die intraartikuläre MP - Injektion mit 7 tägiger Inkubation. Ebenso finden sich deutlich mehr positive Zellen in der MI - Gruppe. Vergrößerung: 200 fach.

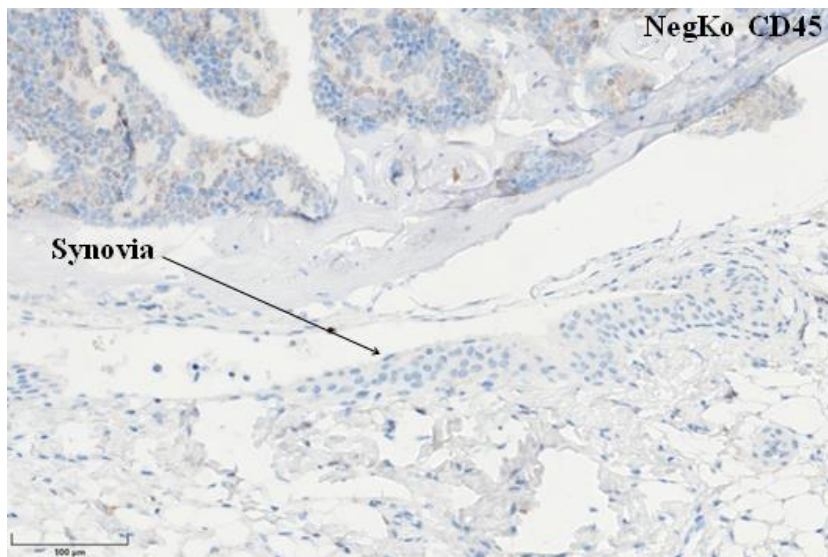


Abb. 25 (basierend auf Cheng X., Dirmeier S.C. et al., 2020 [208])

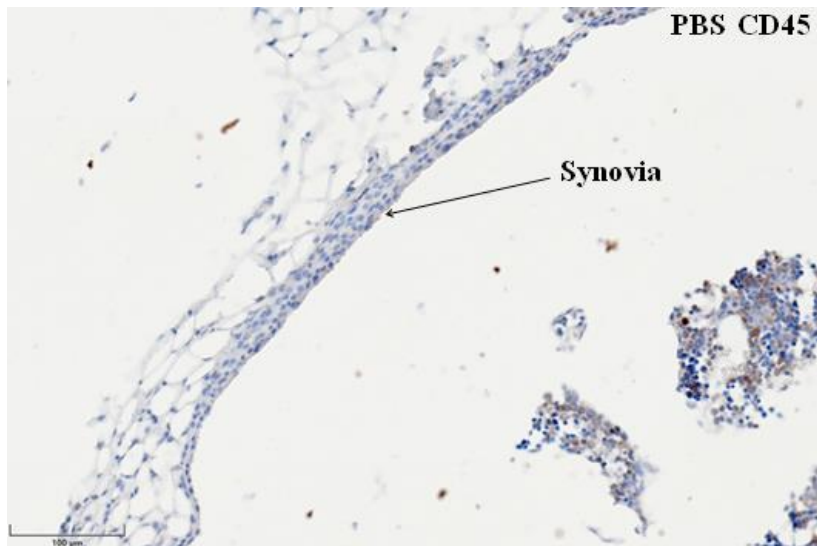


Abb. 26 (basierend auf Cheng X., Dirmeier S.C. et al., 2020 [208])

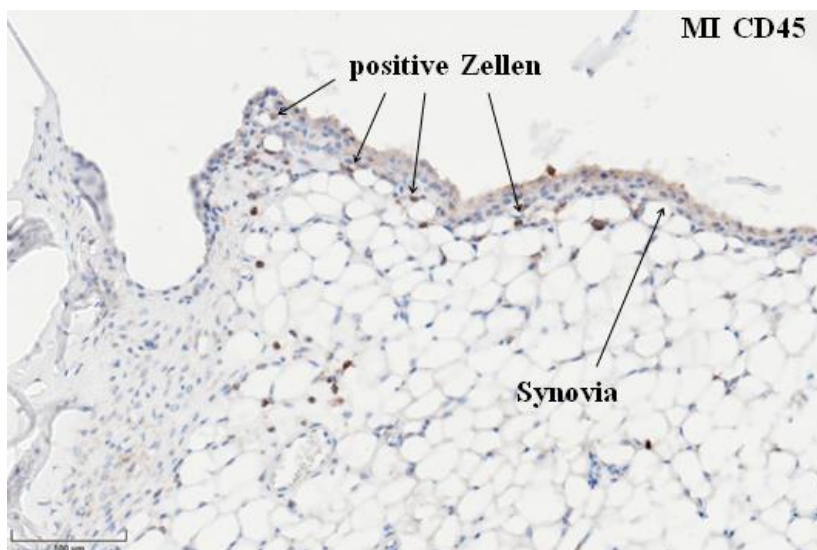


Abb. 27 (basierend auf Cheng X., Dirmeier S.C. et al., 2020 [208])

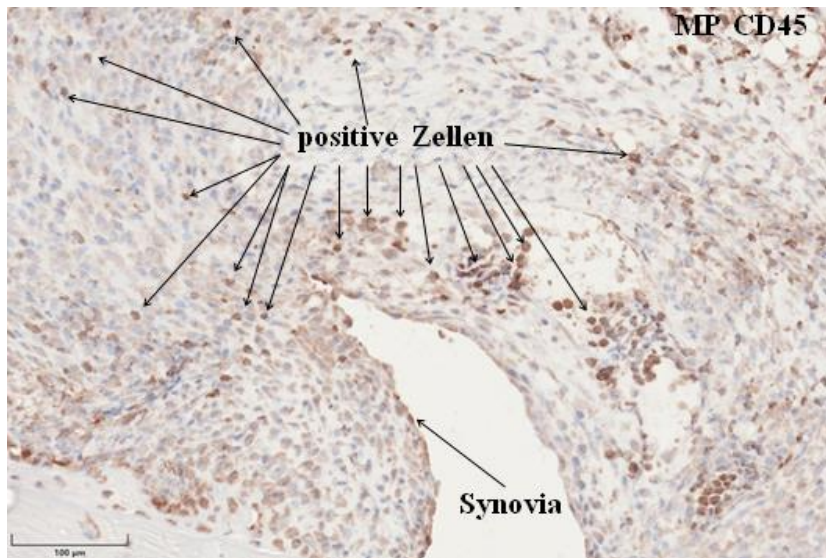


Abb. 28 (basierend auf Cheng X., Dirmeier S.C. et al., 2020 [208])

6.1.6 CD 3 - positive Zellen im Synovialgewebe der linken Kniegelenke

Die Analyse der Synovialgewebe der linken murinen Kniegelenke (Z.n. Injektion von PBS, Metallionen, Metall- oder Polyethylenpartikeln mit anschließender 7 tägiger Inkubation) ergab innerhalb der PBS - Gruppe ($n_{\text{PBS}} = 10$) einen Median von 0,00 positive Zellen/Gesichtsfeld (Min. 0,00; Max. 0,57 positive Zellen/Gesichtsfeld). Ähnliche Werte erzielte auch die MI - Gruppe ($n_{\text{MI}} = 10$) mit 0,00 positiven Zellen/Gesichtsfeld (Min. 0,00; Max. 0,17 positive Zellen/Gesichtsfeld) im Median. Die MP - Gruppe ($n_{\text{MP}} = 10$) ergab ebenfalls kaum eine Expression CD 3 - positiver Zellen mit einem Median von nur 0,13 positiven Zellen/Gesichtsfeld (Min. 0,00; Max. 0,25 positive Zellen/Gesichtsfeld). In der NegKo - Gruppe ($n_{\text{NegKo}} = 5$) konnte keine Expression CD 3 - positiver Zellen festgestellt werden.

Somit ergaben sich im direkten Gruppenvergleich hinsichtlich einer Expression CD 3 - positiver Zellen keine statistisch signifikanten Werte [208]. **Abb. 29** veranschaulicht hierbei anhand von Boxplots die CD 3 - Expression im Gruppenvergleich.

Abb. 29 (basierend auf Cheng X., Dirmeier S.C. et al., 2020 [208]) zeigt keine statistisch signifikante Überexpression CD 3 - positiver Zellen in allen Gruppen im direkten Vergleich.

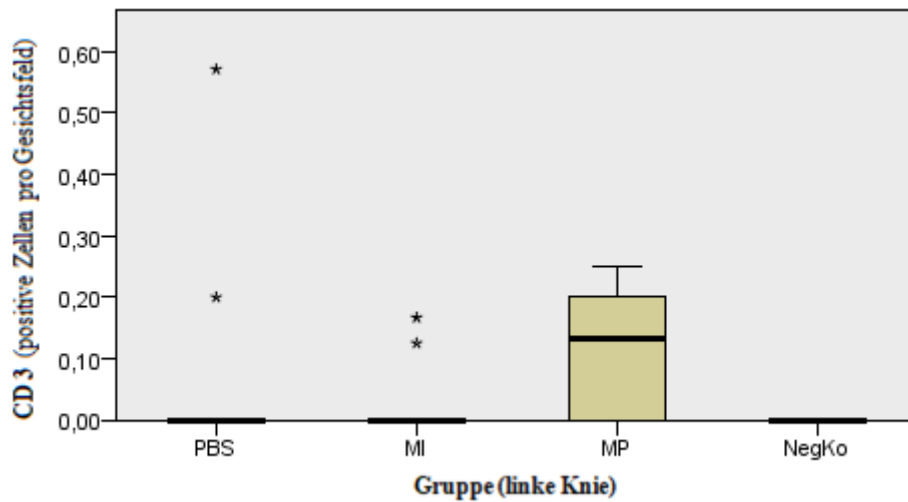


Abb. 30 - 33 zeigen jeweils das Synovialgewebe der linken murinen Kniegelenke der einzelnen Versuchsgruppen (PBS-, MP-, MI - Gruppe) sowie der NegKo - Gruppe in immunhistochemischer Anfärbung mit CD 3 - Antikörpern. In **Abb. 33** ist ein Ausschnitt der deutlich verdickten Synovia mit einer CD 3 - positiven Zelle zu sehen als Reaktion auf die intraartikuläre MP - Injektion mit 7 tägiger Inkubation. In den restlichen Gruppen fanden sich so gut wie keine CD 3 - positiven Zellen.

Vergrößerung: 200 fach.

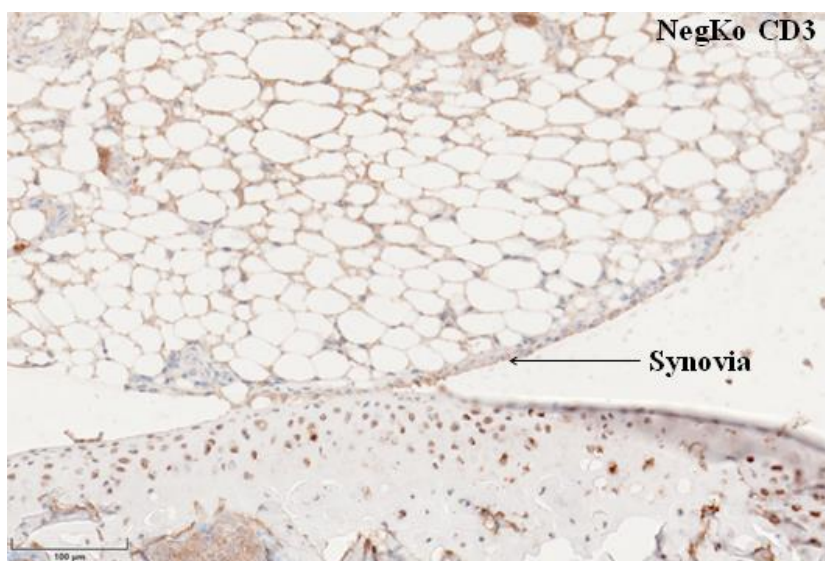


Abb. 30

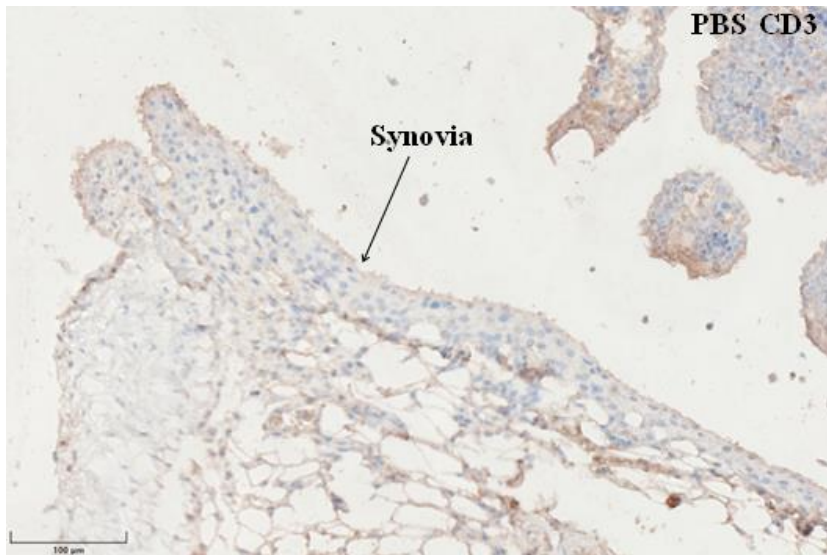


Abb. 31

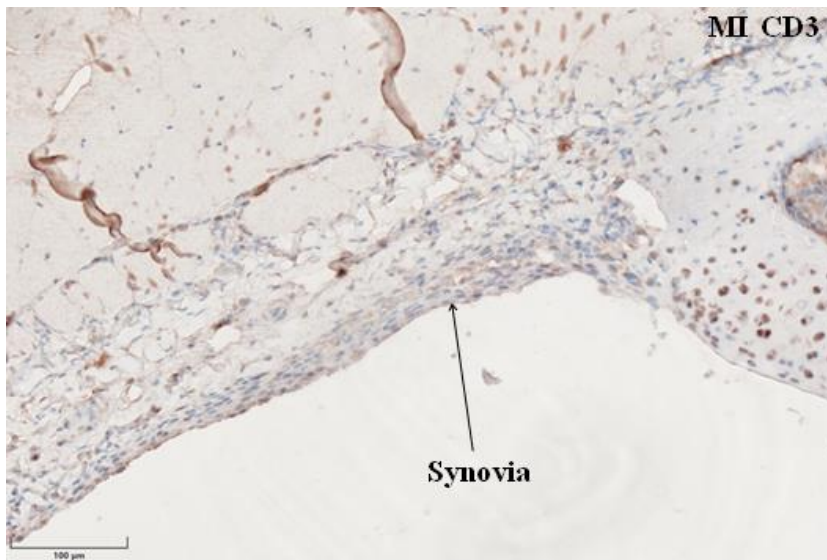


Abb. 32

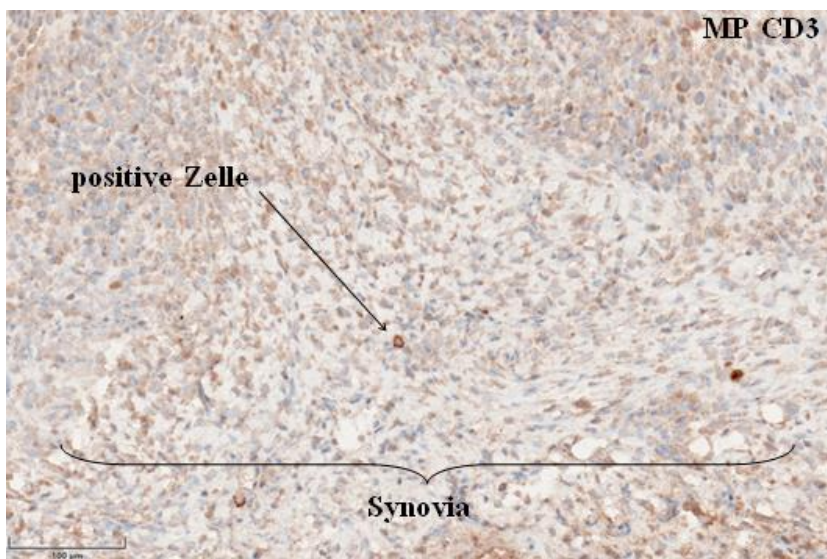


Abb. 33

6.2 Ergebnisse der Entzündungsreaktion der rechten Kniegelenke

Zur Analyse einer systemischen Entzündungsreaktion wurde das Synovialgewebe der unbehandelten, rechten murinen Kniegelenke immunhistochemisch untersucht.

6.2.1 TNF α - positive Zellen im Synovialgewebe der rechten Kniegelenke

Die Analyse des Synovialgewebes der rechten murinen Kniegelenke ergab hinsichtlich der Expression TNF α - positiver Zellen in der MP - Gruppe einen statistisch signifikanten Unterschied gegenüber der NegKo - ($p = 0,002$) und PBS - Gruppe ($p = 0,013$) [208]. Kein statistisch signifikanter Unterschied konnte zwischen der PBS - und der NegKo - Gruppe festgestellt werden ($p = 1,0$). Die MI - Gruppe weist keine statistische Signifikanz gegenüber der anderen Gruppen auf (MI - NegKo: $p = 0,244$; MI - PBS: $p = 0,956$; MI - MP: $p = 0,267$). **Abb. 34** veranschaulicht hierbei anhand von Boxplots die Überexpression TNF α - positiver Zellen des Synovialgewebes der rechten murinen Kniegelenke im Gruppenvergleich.

Abb. 34 (basierend auf Cheng X., Dirmeier S.C. et al., 2020 [208]) zeigt die Überexpression TNF α - positiver Zellen im Synovialgewebe der rechten murinen (unbehandelten) Kniegelenke im Gruppenvergleich. Dabei statistisch signifikante Erhöhung in der MP - Gruppe [208].

(* $p < 0,05$)

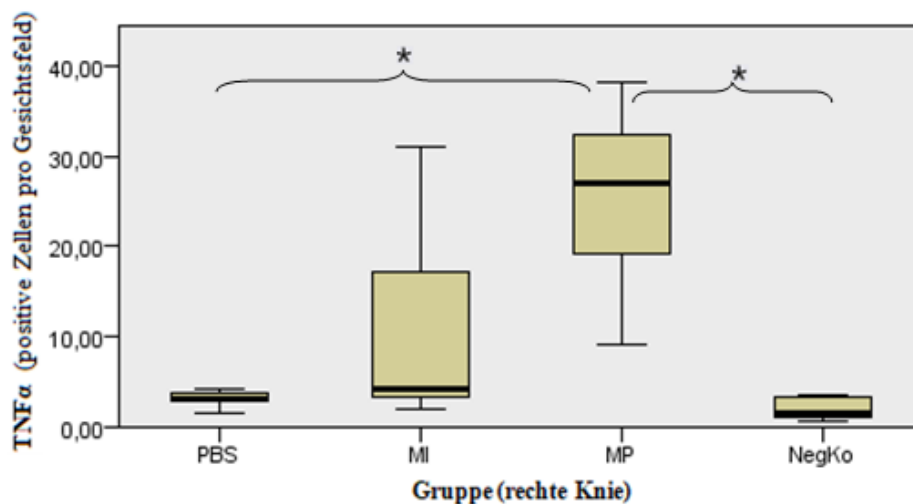


Abb. 35 - 37 zeigen jeweils das Synovialgewebe der rechten murinen Kniegelenke der einzelnen Versuchsgruppen (PBS-, MP-, MI - Gruppe) in immunhistochemischer Anfärbung mit $\text{TNF } \alpha$ - Antikörpern. In **Abb. 37** zeigen sich einige $\text{TNF } \alpha$ - positive Zellen im Sinne einer systemischen Reaktion auf die intraartikuläre MP - Injektion in das linke Kniegelenk. Vergrößerung: 200 fach.

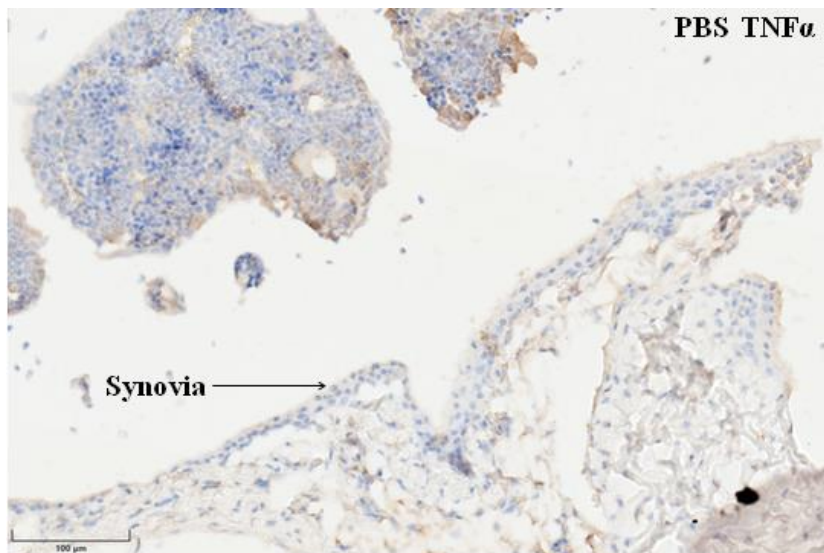


Abb. 35

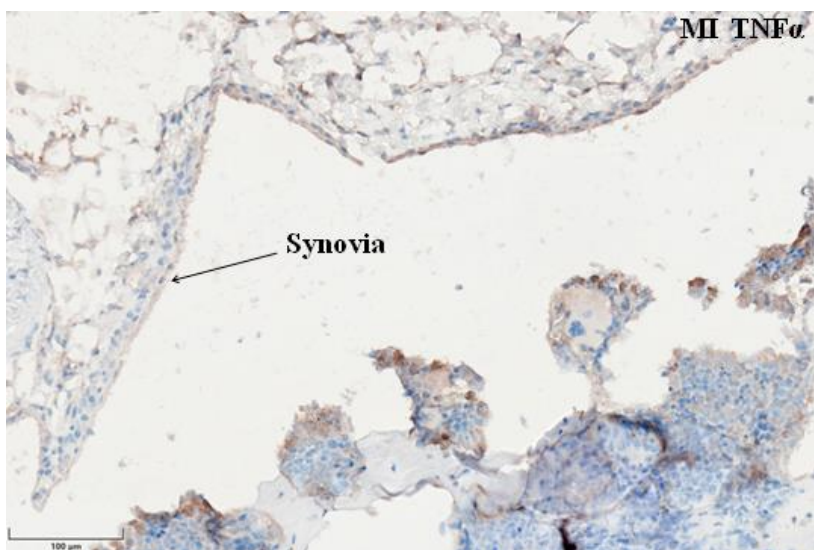


Abb. 36

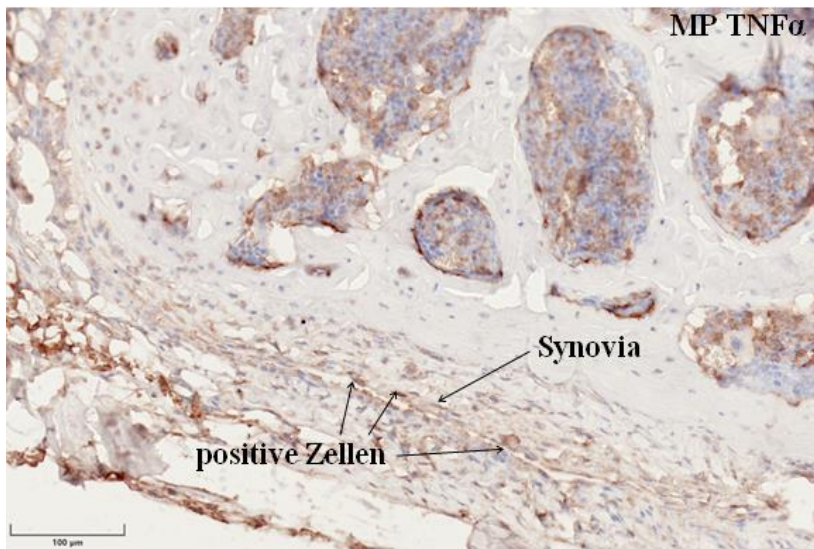


Abb. 37

6.2.2 IL - 6 - positive Zellen im Synovialgewebe der rechten Kniegelenke

In der Analyse des Synovialgewebes der rechten murinen Kniegelenke, zeigte sich keine statistisch signifikante Expression IL - 6 - positiver Zellen im direkten Gruppenvergleich [208]. **Abb. 38** veranschaulicht hierbei anhand von Boxplots die Expression IL - 6 - positiver Zellen im Synovialgewebe der rechten murinen Kniegelenke.

Abb. 38 (basierend auf Cheng X., Dirmeier S.C. et al., 2020 [208]) zeigt die Expression IL - 6 - positiver Zellen im Synovialgewebe der rechten murinen Kniegelenke ohne statistisch signifikante Ergebnisse [208].

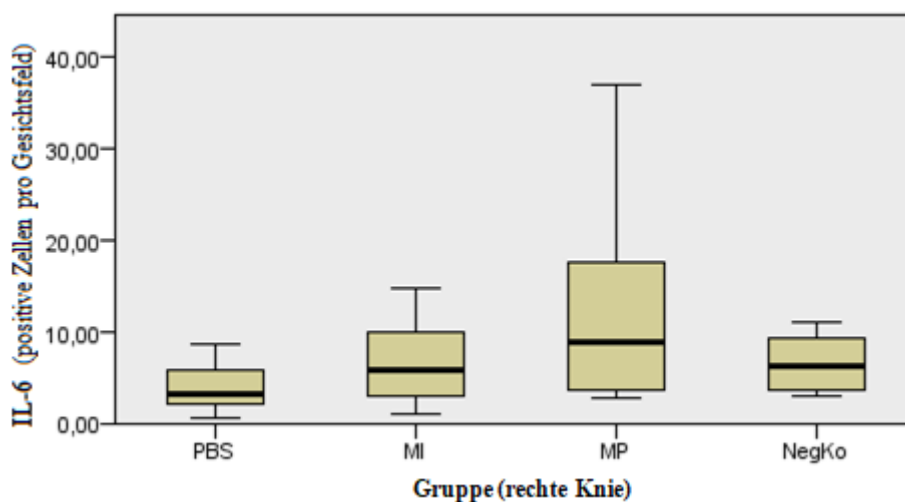


Abb. 39 - 41 zeigen jeweils das Synovialgewebe der rechten murinen Kniegelenke der einzelnen Versuchsgruppen (PBS-, MP-, MI - Gruppe) in immunhistochemischer Anfärbung mit IL - 6 - Antikörpern. Es zeigen sich kaum IL - 6 - positive Zellen als Zeichen einer systemischen Reaktion auf die intraartikuläre Injektion der Suspensionen in das linke Kniegelenk. Vergrößerung: 200 fach.

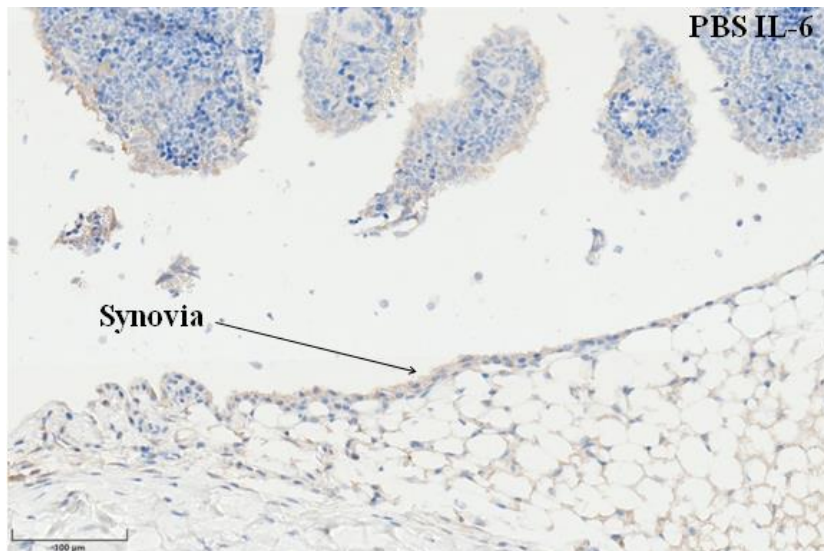


Abb. 39

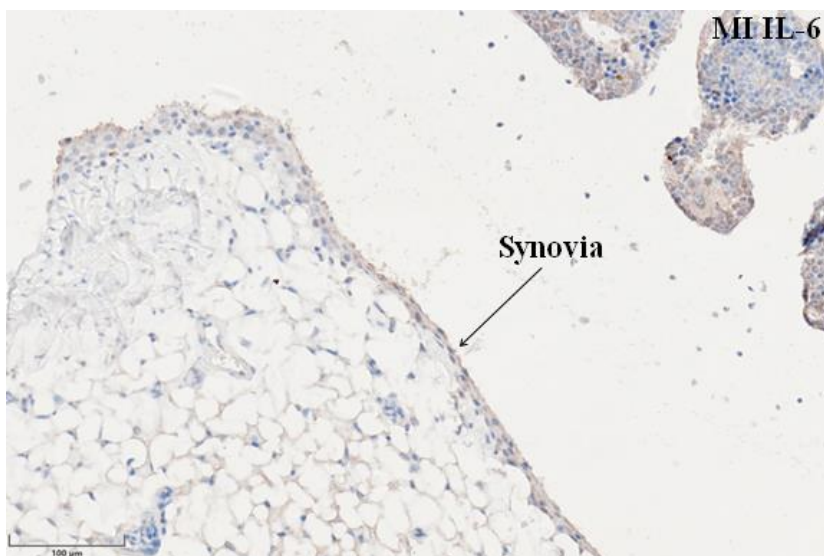


Abb. 40

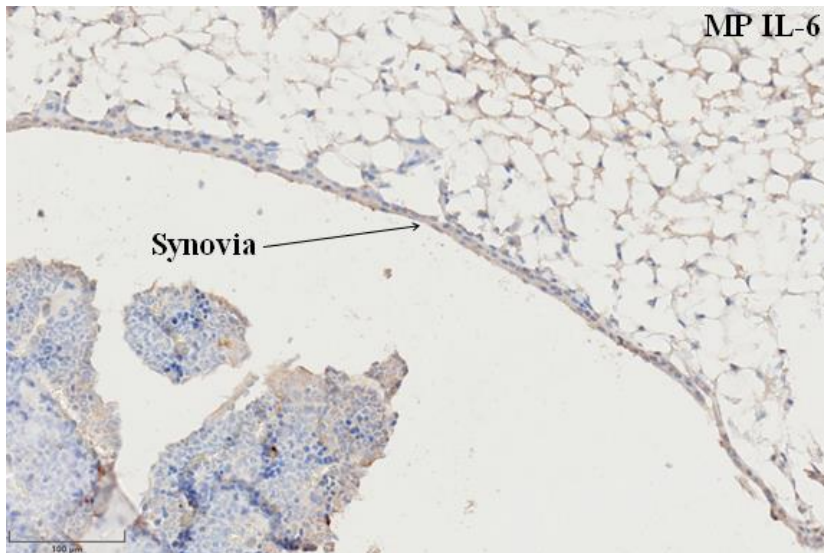


Abb. 41

6.2.3 IL - 1 β - positive Zellen im Synovialgewebe der rechten Kniegelenke

Die Analyse des Synovialgewebes der rechten murinen Kniegelenke ergab eine statistisch signifikante Expression IL - 1 β - positiver Zellen in der MP - verglichen zur PBS - Gruppe ($p = 0,033$) [208].

Unter den restlichen Gruppen konnte im direkten Vergleich kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden (PBS - NegKo: $p = 1,0$; PBS - MI: $p = 1,0$; NegKo - MI: $p = 1,0$; NegKo - MP: $p = 0,51$; MI - MP: $p = 0,133$).

Abb. 42 veranschaulicht hierbei anhand von Boxplots die Expression IL - 1 β - positiver Zellen des Synovialgewebes der rechten murinen Kniegelenke im Gruppenvergleich.

Abb. 42 (basierend auf Cheng X., Dirmeier S.C. et al., 2020 [208]) zeigt die Überexpression IL - 1 β - positiver Zellen im Synovialgewebe der rechten murinen Kniegelenke. Dabei statistisch signifikante Erhöhung in der MP - Gruppe [208].

(* p < 0,05)

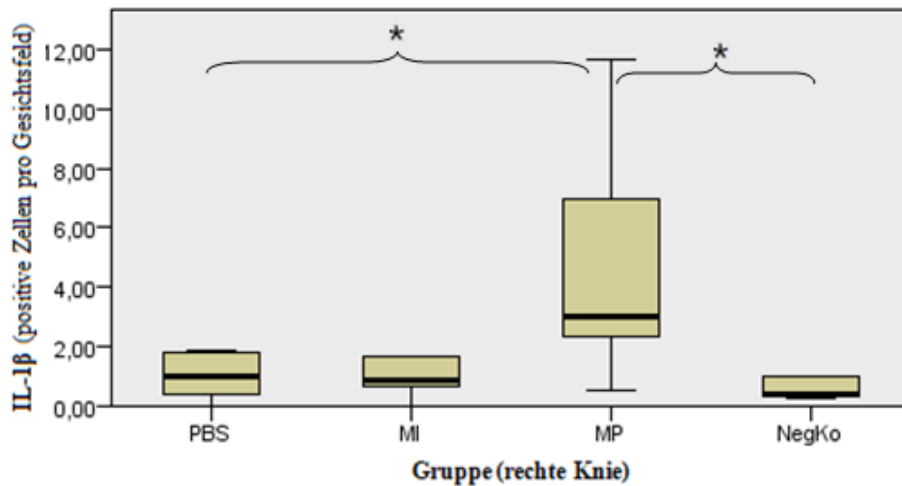


Abb. 43 - 45 zeigen jeweils das Synovialgewebe der rechten murinen Kniegelenke der einzelnen Versuchsgruppen (PBS -, MP -, MI - Gruppe) in immunhistochemischer Anfärbung mit IL - 1 β - Antikörpern. In **Abb. 45** zeigen sich wenige IL - 1 β - positive Zellen als systemische Reaktion auf die intraartikuläre MP - Injektion.

Vergrößerung: 200 fach.

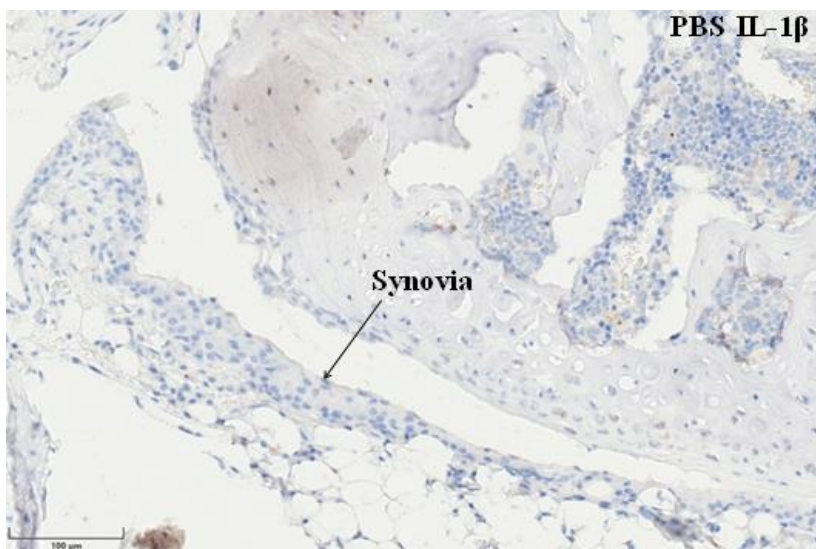


Abb. 43

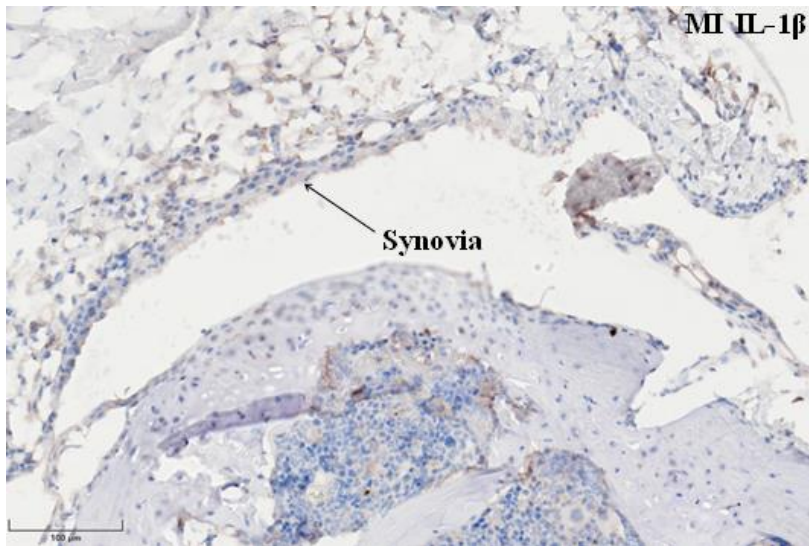


Abb. 44

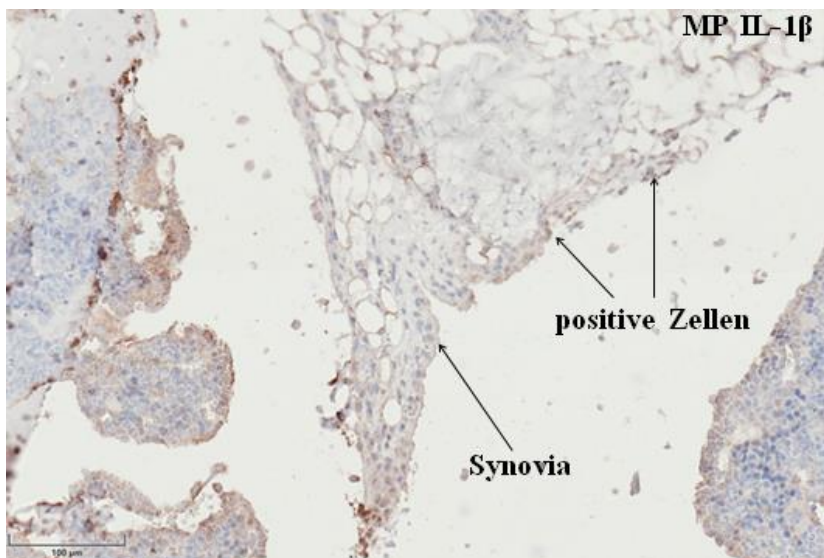


Abb. 45

6.2.4 CD 68 - positive Zellen im Synovialgewebe der rechten Kniegelenke

Die Analyse des Synovialgewebes der rechten murinen Kniegelenke ergab keine statistisch signifikante Expression CD 68 - positiver Zellen im direkten Gruppenvergleich [208]. **Abb. 46** veranschaulicht hierbei anhand von Boxplots die Expression CD 68 - positiver Zellen im Synovialgewebe der rechten murinen Kniegelenke.

Abb. 46 (basierend auf Cheng X., Dirmeier S.C. et al., 2020 [208]) zeigt die Expression CD 68 - positiver Zellen im Synovialgewebe der rechten murinen Kniegelenke ohne statistisch signifikante Ergebnisse [208].

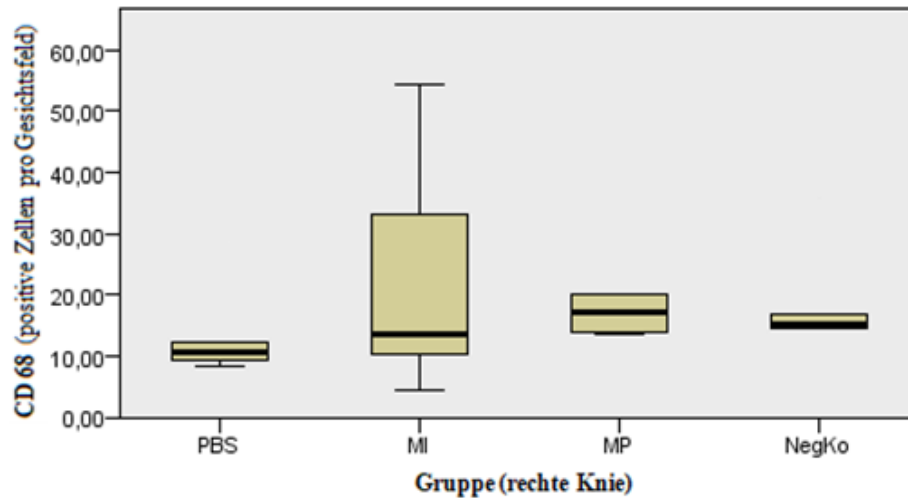


Abb. 47 - 49 zeigen jeweils das Synovialgewebe der rechten murinen Kniegelenke der einzelnen Versuchsgruppen (PBS -, MP -, MI - Gruppe) in immunhistochemischer Anfärbung mit CD 68 - Antikörpern. Es zeigen sich kaum CD 68 - positive Zellen als Zeichen einer systemischen Reaktion auf die intraartikuläre Injektion der Suspensionen in das linke Kniegelenk. Vergrößerung: 200 fach.

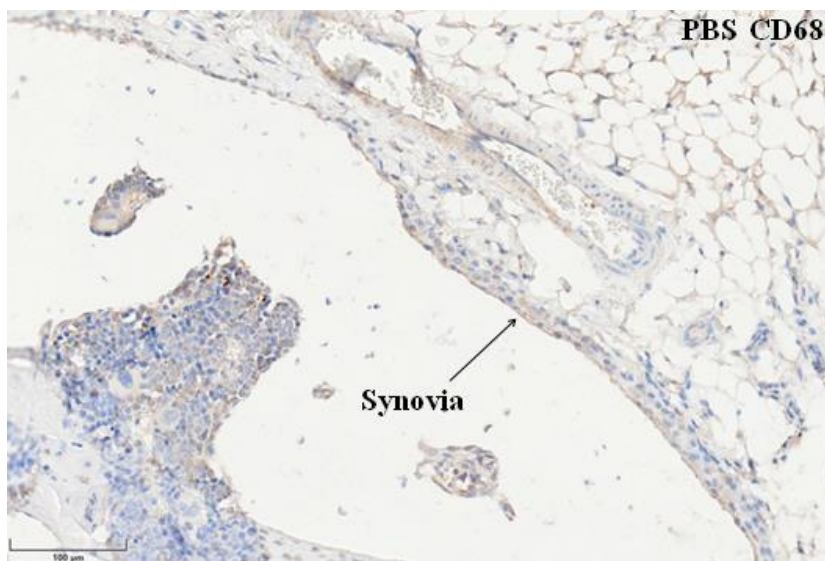


Abb. 47

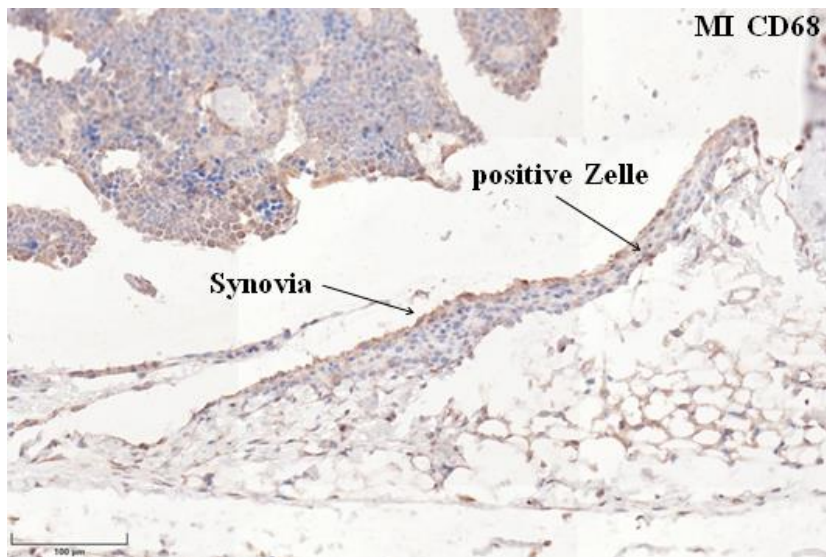


Abb. 48

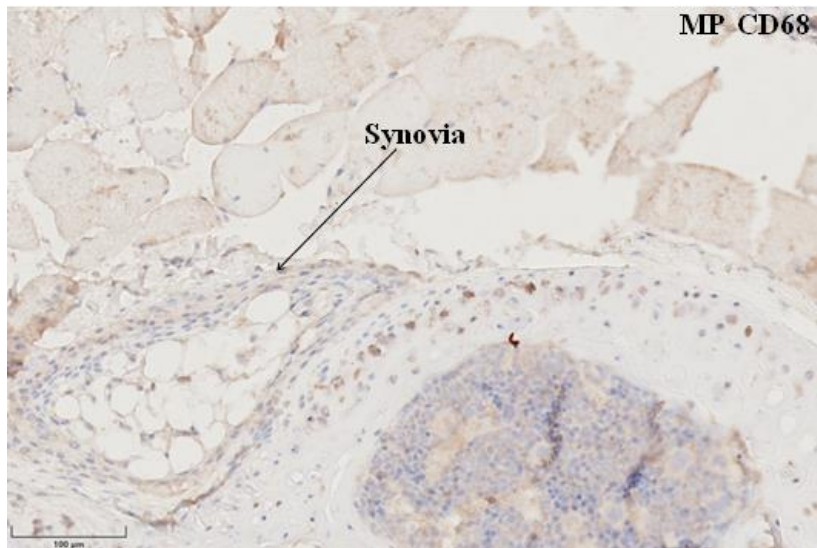


Abb. 49

6.2.5 CD 45 - positive Zellen im Synovialgewebe der rechten Kniegelenke

In der Analyse des Synovialgewebes der rechten murinen Kniegelenke zeigte sich die Expression CD 45 - positiver Zellen in der MI - Gruppe statistisch signifikant erhöht gegenüber allen anderen Gruppen (zu NegKo: $p = 0,047$; zu PBS: $p = 0,002$; zu MP: $p = 0,000$) [208]. Kein statistisch signifikanter Unterschied konnte im direkten Vergleich der PBS -, NegKo - und der MP - Gruppe untereinander festgestellt werden (jeweils $p = 1,0$) [208]. **Abb. 50** veranschaulicht hierbei anhand von Boxplots die Überexpression CD 45 - positiver Zellen im Synovialgewebe der rechten murinen Kniegelenke.

Abb. 50 (basierend auf Cheng X., Dirmeier S.C. et. al, 2020 [208]) zeigt die Überexpression CD 45 - positiver Zellen im Synovialgewebe der rechten murinen Kniegelenke. Dabei statistisch signifikante Erhöhung in der MI - Gruppe gegenüber allen anderen Gruppen [208].

(* $p < 0,05$)

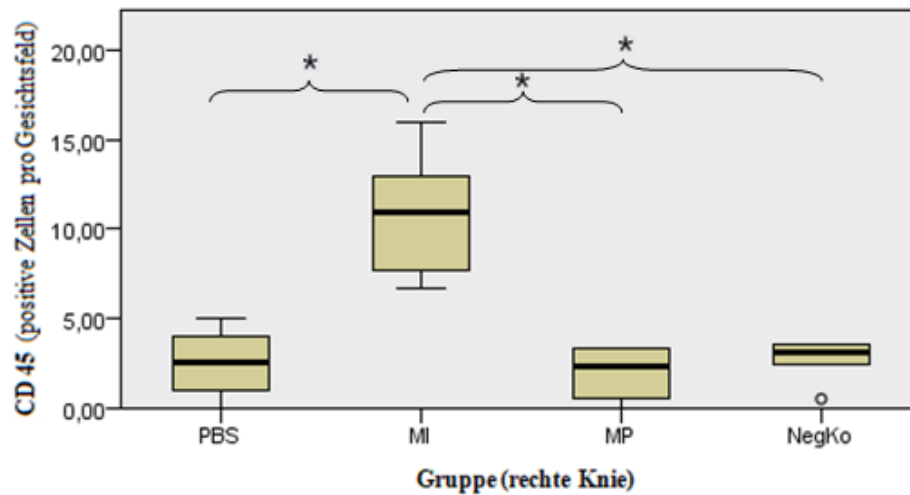


Abb. 51 - 53 zeigen jeweils das Synovialgewebe der rechten murinen Kniegelenke der einzelnen Versuchsgruppen (PBS -, MP -, MI - Gruppe) in immunhistochemischer Anfärbung mit CD 45 - Antikörpern. In **Abb. 52** zeigen sich CD 45 - positive Zellen im Synovialgewebe der rechten Kniegelenke als mögliches Zeichen einer systemischen Reaktion nach MI - Injektion in das linke Knie. Vergrößerung: 200 fach.

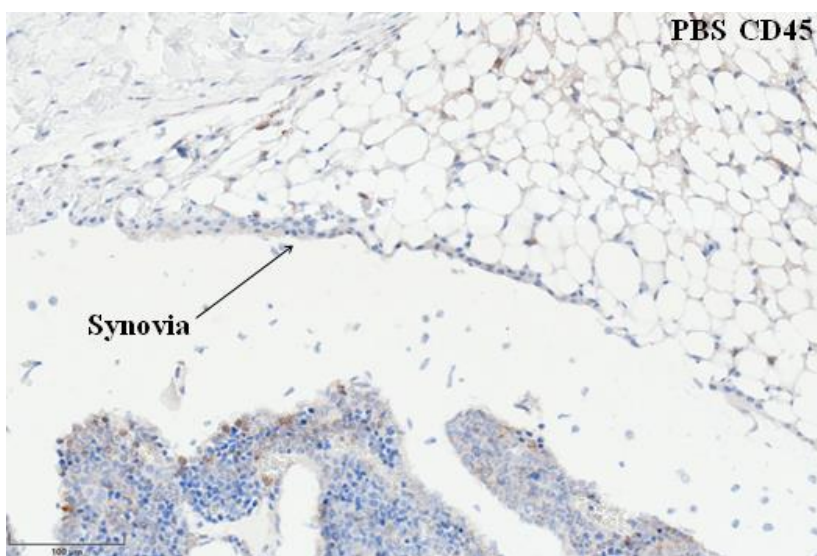


Abb. 51

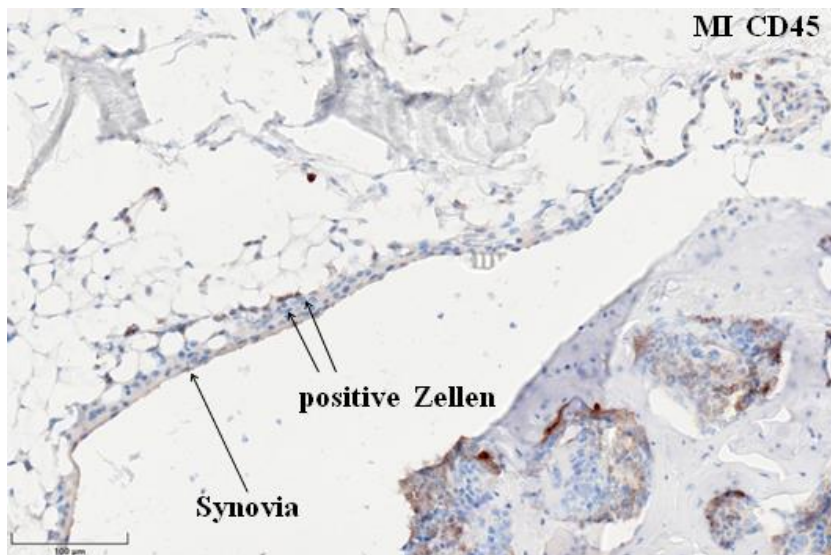


Abb. 52

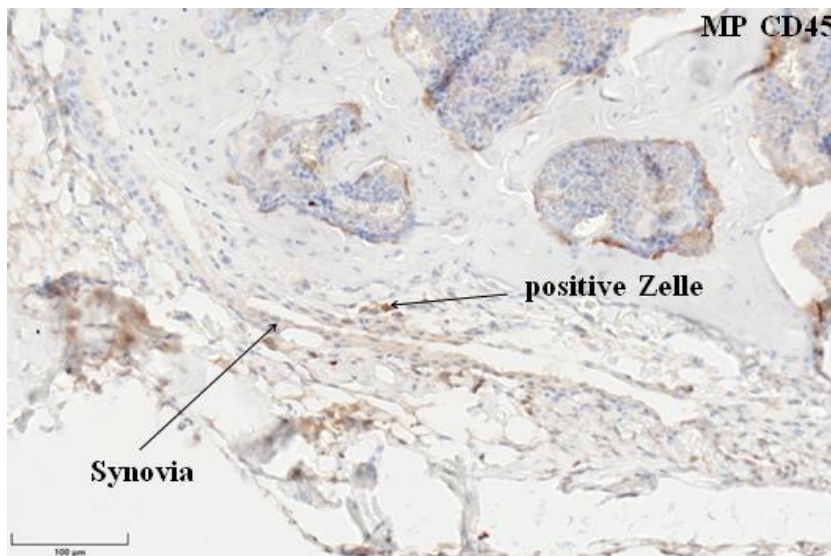


Abb. 53

6.2.6 CD 3 - positive Zellen im Synovialgewebe der rechten Kniegelenke

Die Analyse des Synovialgewebes der rechten murinen Kniegelenke ergab keine statistisch signifikante Expression CD3 - positiver Zellen im direkten Gruppenvergleich [208]. **Abb. 54** veranschaulicht hierbei anhand von Boxplots die Expression CD 3 - positiver Zellen im Synovialgewebe der rechten murinen Kniegelenke.

Abb. 54 (basierend auf Cheng X., Dirmeier S.C. et. al, 2020 [208]) zeigt die Expression CD 3 - positiver Zellen im Synovialgewebe der rechten murinen Kniegelenke ohne statistisch signifikante Ergebnisse [208].

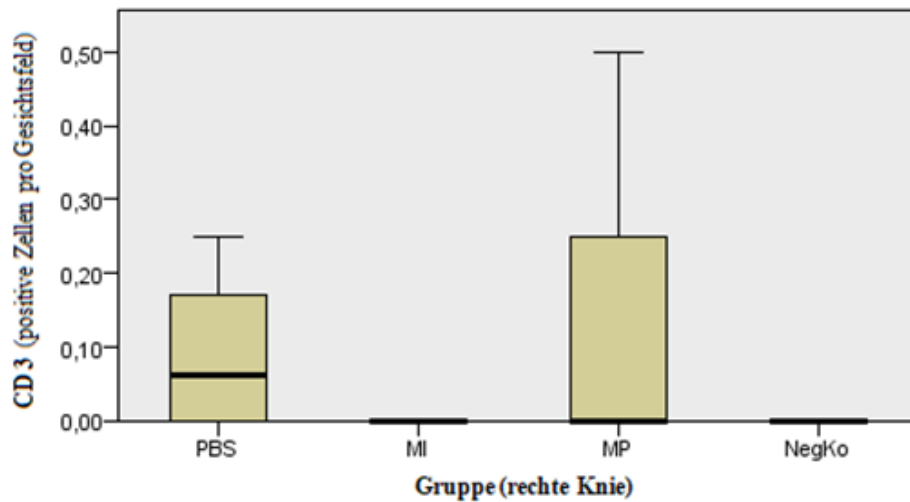


Abb. 55 - 57 zeigen jeweils das Synovialgewebe der rechten murinen Kniegelenke der einzelnen Versuchsgruppen (PBS -, MP -, MI - Gruppe) in immunhistochemischer Anfärbung mit CD 3 - Antikörpern. Es zeigen sich hier keine CD 3 - positiven Zellen als Zeichen einer systemischen Reaktion. Vergrößerung: 200 fach.

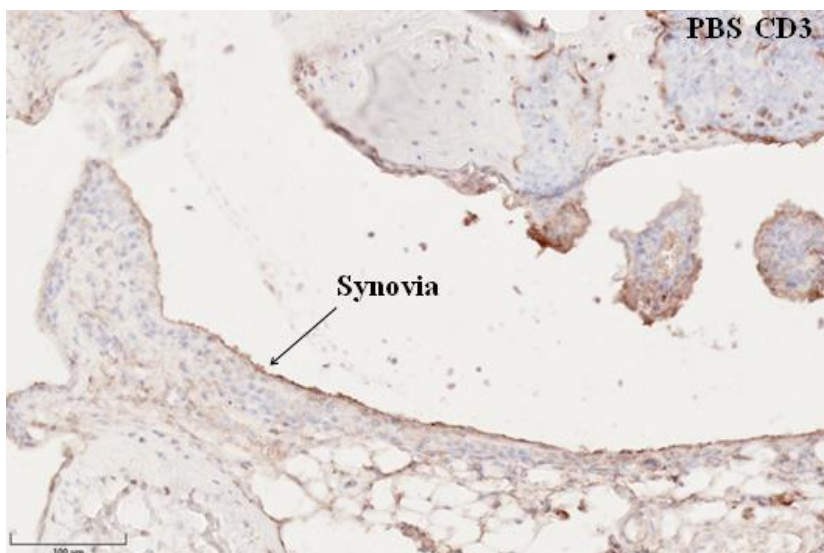


Abb. 55

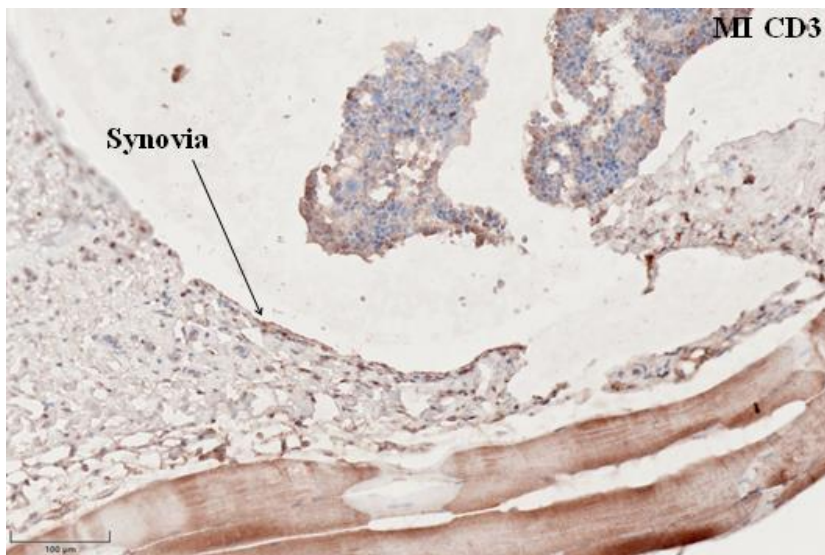


Abb. 56

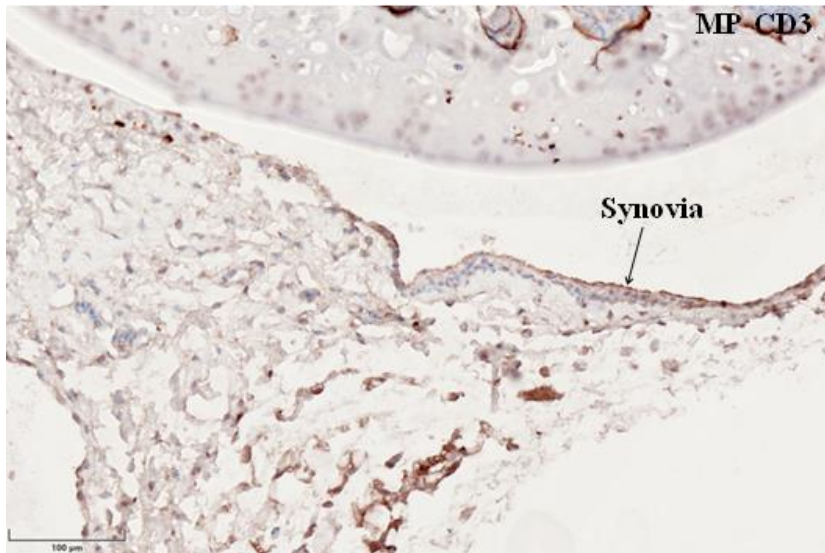


Abb. 57

7 Diskussion

Der häufigste Grund für das Versagen einer Hüftendoprothese und damit Revisionseingriffes ist die aseptische Prothesenlockerung [14, 207, 219], aufgrund einer abriebinduzierten Entzündungsreaktion mit nachfolgender Osteolyse [18, 54, 55, 57, 61, 74, 76, 117, 220, 221].

Viele Publikationen belegen, dass die zentralen Mediatoren hinsichtlich der Initiierung und Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion, die Zytokine $\text{TNF}\alpha$, IL - 1 β und IL - 6 sind [83, 141, 179, 222-225].

Makrophagen nehmen dabei eine Schlüsselrolle ein [14, 226]. Durch Abrieb - Kontakt sezernieren diese o.g. Schlüssel - Mediatoren und rekrutieren weitere immunkompetente Zellen [225, 227]. Des Weiteren sind sie befähigt, abriebinduziert die Rolle knochenresorbierender Osteoklasten einzunehmen, was die folgende Knochenresorption zusätzlich unterhält [88, 228].

In diesem *in - vivo* - Mausmodell wurde (respektive bei misslungener Polyethylen - Gruppe) die primäre aseptische Entzündungsreaktion im Gewebe von Metallpartikeln (CoCrMo) mit Metallionen verglichen [208].

Von besonderem Interesse war, welcher der Abriebkomponenten die stärkste bioreaktive Antwort im Gewebe hervorrief. Dieses Ausmaß wurde quantitativ anhand immunhistochemischer Marker wie $\text{TNF}\alpha$, IL - 1 β und IL - 6 gemessen [208]. Die Beteiligung von Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems an dieser Entzündungsreaktion wurde mittels Immunhistochemie quantitativ mit den Antikörpern für CD 68, CD 45 und CD 3 erfasst [208].

Zusätzlich wurde die Synovialmembran der unbehandelten rechten Kniegelenke mit den gleichen Antikörpern auf das Vorliegen einer möglichen systemischen Entzündungsreaktion untersucht [208].

Dies ist die erste *in - vivo* Studie die im direkten Vergleich zum einen die biologische Reaktion von Metallpartikeln und - ionen im lokal behandelten Gewebe untersucht und zum anderen entzündliche Prozesse im unbehandelten Knie analysiert, im Sinne einer systemischen Inflammation [208].

Studienergebnisse anhand von Mausmodellen liefern oft wesentliche Ansatzpunkte für eine modifizierte Übertragung auf den Menschen. So zeigen oft biologische Reaktionen der Maus eine wesentliche Übereinstimmung mit denen des Menschen [52, 54]. Vor allem hinsichtlich der Inflammationsreaktion zeigen sich Gemeinsamkeiten [229], sodass

Erkenntnisse aus Mausmodellen zu erfolgsversprechenden immunmodulatorischen Therapien für den Menschen geführt hat [230].

Dieses *in vivo* - Modell nutzt gegenüber *in vitro* - Modellen den Vorteil der Komplexität, welche durch die Interaktion zahlreicher Zell- und Gewebearten zustande kommt [126]. Die Rekrutierung von anderen Zellen über multiple molekularbiologische Botenstoffe und verschiedenste Signalwege, die den Organismus befähigen auf einen Fremdkörper zu reagieren, kann ein *in vitro* - Modell so nicht leisten [126].

In vitro - Modelle reflektieren vor allem die Reaktion von isolierten, spezifischen Zelllinien [52, 60, 126]. So zeigten sich Makrophagen in zahlreichen Studien als eine der wichtigsten Zellpopulationen, die am Entzündungsprozess und der Knochenresorption teilnehmen [52, 60, 140, 231], jedoch bleibt die Interaktion mit anderen Zellen im Gewebe unberücksichtigt.

Einen Vorteil gegenüber anderen *in vivo* - Modellen (z.B. Schädelkalotten - Modell [232, 233], „Air - Pouch“ - Model [53, 234]) sehen wir in der Imitation einer Entzündungsreaktion direkt im Gelenk, so wie es sich im Hüftgelenk nach Prothesenimplantation abspielen könnte [74, 235]. Das Zellmilieu der Synovia im murinen Knie ähnelt dem der periprotehtischen Membran, welche sich bei Patienten nach Implantation einer Hüftendoprothese zwischen Implantatoberfläche und Knochen bildet [77-79, 84].

An diesem Zellmilieu beteiligt sind allen voran Makrophagen, Fibroblasten und multinukleäre Riesenzellen [74, 84], welche nach Kontakt mit Abrieb proinflammatorische Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$, IL - 1 β und IL - 6 freisetzen und damit eine Zunahme immunkompetenter Zellen samt Osteoklasten bewirken [57, 76, 89, 117, 222, 227, 236].

Die Ähnlichkeit der murinen Synovia zur periprotehtischen Membran wurde in diesem Tiermodell genutzt, um quantitativ und qualitativ die primäre Abwehrreaktion des Gewebes auf Partikel und Ionen zu untersuchen [208]. Das synoviale Inflammationsmodell der Maus mit intraartikulärer Injektion hatte sich bereits in vorherigen Studien sehr bewährt [74-76, 209-211, 237].

Die Injektion intraartikulär, anstelle von intramuskulär oder intrakutan, ermöglicht eine Verteilung im Gelenkraum und imitiert eher den natürlichen Verteilungsweg des Abriebs [74]. Erhöhte Partikel- und Ionenkonzentrationen in der Synovialflüssigkeit bei Patienten mit Endoprothesen bestätigen auch diesen Gedanken [238, 239].

Weitere *in - vivo* - Studien nutzten chirurgisch präformierte Höhlen über der Schädelkalotte [232, 233] oder im Mäusrücken [53, 234], für das Einbringen verschiedener Partikelarten.

Das Schädelkalottenmodell diente hierbei eher der Quantifizierung der Knochenresorption als dem Nachweis proinflammatorischer Zytokine [232, 233].

Bei der Methode des „Air - Pouch“ - Modells werden nach Erzeugung eines subkutanen Luftkissens in die untere Rückenhaut Partikel injiziert und so eine Entzündung provoziert. Dieses Modell zeigt sich zwar sensitiv für den Nachweis von immunkompetenten Zellen [234] oder proinflammatorischen Zytokinen [53], jedoch fehlen diesem Modell die Zellpopulationen eines Gelenks, deren Wechselwirkung untereinander das Ausmaß der Entzündungsreaktion maßgeblich beeinflussen [208].

Zur Analysierung der primären Entzündungsreaktion auf Abrieb endoprothetischer Materialien ist sicherlich eine Stärke dieser Studie, die Wahl dieses *in - vivo* - Modells, mit welchem bereits Utzschneider et al. und Zysk et al. erfolgreich Entzündungsreaktionen auf Abrieb nachweisen konnten [74, 76, 209, 237].

Neben der Wahl eines geeigneten Modells, geben auch die verwendeten Testpartikel und - ionen hinsichtlich ihrer Morphologie und verabreichten Dosis einen Grund zur Diskussion.

Die Partikelmorphologie meint deren Zusammensetzung, Größe und Form. Diese nimmt einen entscheidenden Einfluss auf das Entzündungsgeschehen [54, 94, 116]. So zeigen sich nanometergroße Partikel biologisch am reaktivsten im Gegensatz zu Partikeln im Mikrometerbereich [240]. Dies kann sich in einem Anstieg von Entzündungsparametern wie $\text{TNF}\alpha$, IL - 1 β und IL - 6 äußern, die letztendlich die Osteoklastenaktivität hochregulieren [72, 241].

Eine Limitierung vieler Studien ist die oftmals starke Varianz in der Partikelmorphologie. Partikel von MoM - Implantaten, die aus Revisionsgewebe gewonnen werden, weisen vorwiegend eine durchschnittliche Größe im Nanometerbereich auf (40 - 80 nm) und zeigen hauptsächlich eine runde bis ovale, teils irreguläre Form [68, 242]. Aus Simulatoren gewonnene Partikel kommen in ihrer Größe und Form, den der klinisch entstandenen Partikel am nächsten und liegen größtenteils bei 50 nm, mit einer rundlichen bis irregulären Form [242]. Kommerziell erworbene Partikel hingegen variieren sehr in ihrer Größe und Form verglichen zu klinisch erzeugten Partikeln [94].

Daher ist eine weitere Stärke dieser Studie die hier verwendeten Metallpartikel, die durchschnittlich im Nanometerbereich liegen (61,25 +/- 18,47 nm) und in ihrer runden bis ovalen Form nahezu dem klinisch erzeugtem Abrieb gleichen [208].

Neben der Partikelmorphologie ist auch die hier applizierte Partikel- und Ionendosis von großer Bedeutung für die Gewebeantwort. So können zu hoch dosierte Metallionenkonzentrationen zytotoxisch wirken [243, 244] und spiegeln weniger die Situation im Gelenk wieder. Hierbei zeigt sich allerdings die Datenlage zur Metallionenbelastung im Gelenk kontrovers. Manchen Studien stellten in der Synovialflüssigkeit von MoM - Trägern Cobalt- und Chromionenkonzentrationen über 1.000 µg/l fest [48, 49]. Jedoch traten diese Patienten auch klinisch in Erscheinung mit Weichteilreaktionen wie der Metallose [43] oder der Entstehung von Pseudotumoren [130, 131] im Sinne einer ARMD (Adverse reactions to metal debris).

De Smet et al. hingegen analysierten Gelenkspunktate vor Revisionseingriffen bei Patienten ohne Metallose und fanden eine mittlere Konzentration von 200 - 250 µg/l [146]. Anhand dieser Werte orientierte sich letztendlich die applizierte Metallionendosis in unserer Arbeit [208].

Die verwendete Partikeldosis orientierte sich an bewährten Vorarbeiten von Utzschneider et al. sowie Zysk et al., die ebenfalls Partikelsuspensionen mit 0,1 Vol.% intraartikulär verabreichten [74-76, 209, 237].

Der immunhistochemische Nachweis von Zellen der angeborenen und erworbenen Immunantwort erfolgte mittels Antikörper für CD 68 (Makrophagen), CD 45 (Panleukozytenmarker) und CD 3 (T - Zellen) [208]. Interessanterweise zeigte sich weder in der MP - noch in der MI - Gruppe eine nennenswerte Anzahl von T - Zellen [208].

Angelehnt an die Literatur fanden einige Autoren Weichteilwucherungen überwiegend mit MoM - Implantaten assoziiert, als Ausdruck von Lymphozyteninfiltrationen und bezeichneten diese als Pseudotumore [131, 245]. Pandit et al. testeten das Revisionsgewebe von Patienten, bei denen es zu einer sichtbaren Massenzunahme im periprothetischen Weichteilgewebe bei MoM - Prothesen kam [130]. Neben ausgedehnten Koagulationsnekrosen sowie massiven Makrophageninfiltrationen mit Granulombildung und Riesenzellen, fanden sie diffuse Lymphozyten - (darunter auch CD 3 - Positive) und Plasmazellinfiltrationen. Die Autoren vermuteten hinter dieser Pseudotumorentstehung eine Typ - IV - Hypersensitivitätsreaktion als Ursache [130].

Dieser Reaktion liegt eine Komplexbildung von Metallionen mit körpereigenen Proteinen zugrunde, sogenannte Haptene entstehen und sensitivieren auf diese Art T - Zellen [246-248].

Einige Autoren sehen diese allergische Reaktion mitunter als potentielle Verursacher einer aseptischen Prothesenlockerung [249].

Bezugnehmend auf unsere MI - Gruppe war daher eine Haptenbildung noch als wahrscheinlicher anzunehmen, jedoch erfolgte kein Nachweis von T - Lymphozyten in den Gruppen [208].

An dieser Stelle wird eine Beurteilung dieses Ergebnisses schwierig. Zum einen kann die Entwicklung einer Typ - IV - Hypersensitivitätsreaktion zwei oder mehr Tage dauern [250] und hier möglicherweise der Faktor Zeit eine Rolle spielen, um T - Zellen nachzuweisen. Zum anderen muss hier kritisch die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf eine andere Spezies hinterfragt werden, da es wohl speziell im Rahmen einer verspäteten Hypersensitivitätsreaktion immunologische Unterschiede zwischen Mensch und Maus gibt. Bei letzterer bedarf es einer höheren Antigen - Konzentration zur Auslösung einer Reaktion als es beim Menschen der Fall ist [251].

Möglicherweise mag in wenigen Fällen eine allergische Reaktion eine Rolle spielen, die Häufigkeit einer Metallallergie (vorwiegend gegen Nickel, Chrom und Kobalt) liegt allerdings in der Allgemeinbevölkerung bei näherungsweise 10% [252]. Ob die Typ - IV - Hypersensitivitätsreaktion eine Rolle in der aseptischen Prothesenlockerung spielt, können wir zumindest in dieser Studie am Mausmodell für den primären Inflammationsprozess bei fehlendem Nachweis von T - Zellen ausschließen [208].

Dass diese Reaktion mitunter ursächlich für eine aseptische Prothesenlockerung sein soll, wird durch verschwindend geringe Berichte über Revisionsoperationen (welche mit einer Hypersensitivität assoziiert werden) relativiert [132, 253].

Neben den T - Zellen gibt es in der angeborenen und erworbenen Immunantwort weitere immunkompetente Zellen, die für eine biologische Reaktion auf Partikel und Ionen in Betracht kommen.

Wir haben CD 45 als Panleukozytenmarker verwendet, um damit einen Großteil immunkompetenter Zellen zu detektieren und stellten dabei auch deutliche Unterschiede in den Gruppen fest [208].

In der MP - und MI - Gruppe der linken Kniegelenke (Z.n. intraartikulärer Injektion) zeigten sich signifikant viele CD 45 - positive Zellen (jeweils $p < 0,05$). Interessanterweise auch in der MI - Gruppe der rechten, unbehandelten Kniegelenke, was eine systemische Reaktion mutmaßen lässt [208].

CD 45 wird auf allen kernhaltigen, hämatopoetischen Zellen exprimiert (i.e. exklusive Thrombozyten und Erythrozyten) [62, 193-196, 198]. Ein positives Färbungsergebnis für

CD 45 würde Zellen wie Lymphozyten, Natürliche Killerzellen, Granulozyten, dendritische Zellen und Monozyten/Makrophagen einschließen. Die Interpretation der Ergebnisse zu CD 45 gestaltete sich allerdings schwierig.

Zum einen konnte der Hersteller der von uns verwendeten Antikörper keine Aussage bezüglich der Anfärbbarkeit von Isoformen machen und ob unser CD 45 - Antikörper damit alle Isoformen, also alle in Frage kommenden Zellen erfasst. Zum anderen fiel bei der Sichtung der Literatur zu CD 45 auf, dass dieser hauptsächlich in Verbindung mit B- und noch mehr mit T - Zellen gebracht wird, da CD 45 ein wichtiger Regulator in der Funktion und Differenzierung der Lymphozyten ist [177]. Ein Fehlen von CD 45 zeigt nämlich den Zusammenbruch des Immunsystems, mit einer schweren Funktionsbeeinträchtigung der T - und B - Zellen [198].

Eine T - Zell - Präsenz hatten wir aber mit dem Fehlen CD 3 - positiver Zellen im Gewebe ausschließen können und so käme nur eine Beteiligung der anderen genannten immunkompetenten Zellen in Betracht, wie Makrophagen, Granulozyten, Natürliche Killerzellen oder dendritische Zellen. Makrophagen wurden von uns spezifisch mittels CD 68 angefärbt und stimmten nicht mit dem Färbemuster CD 45 - positiver Zellen überein, womit wir Makrophagen als zugrunde liegende Zellpopulation des CD 45 - Färbemusters ausschließen würden.

Die Literatur zeigt zwar ein Vorkommen von CD 45 auf Makrophagen [198, 254], dennoch soll dort die Expression sehr gering ausgeprägt sein [255], was unsere Vermutung bestätigen würde.

T - Zellen und Makrophagen würden wir als in Frage kommende Zellen ausschließen und so würden nur noch Granulozyten, NK-, dendritische und B - Zellen in Betracht kommen. Die Datenlage zu Granulozyten und ihrer Detektion mittels CD 45 ist ebenfalls sehr dünn. Nur sehr wenige Quellen, wie Lacal et al. berichten über eine Expression auf Granulozyten [256].

Die Arbeitsgruppen von Pandey und Morawietz sahen den Vorteil in der Detektion neutrophiler Granulozyten zur Unterscheidung eines Endoprothesenversagens aufgrund septischer Prozesse von einer aseptischen Gewebereaktion [257, 258].

Morawietz et al. empfahl zur immunhistochemischen Diagnostik von Neutrophilen die Verwendung eines CD 15 - Antikörpers [257].

Dass es sich bei den von uns detektierten Zellen daher um neutrophile Granulozyten handelte, erscheint eher unwahrscheinlich und für Folgestudien bietet sich ein granulozytenspezifischer Marker sicherlich an.

Weitere CD 45 - positive Zellen, die hier in Frage kommen würden, sind Natürliche Killerzellen [196, 259]. Was eher gegen diesen Zelltyp spricht, ist deren Hauptfunktion in der Abwehr von neoplastischen [260] oder virusinfizierten [261-263] Zellen.

Dennoch, obwohl die Datenlage auch hierzu sehr spärlich erscheint, gibt es ein paar wenige Berichte über das Vorhandensein dieser Zellen bei der aseptischen Implantatlockerung [264, 265].

Huss et al. untersuchten synoviales Revisionsgewebe von Patienten mit Hüft- oder Knieendoprothesen (Cobalt - Chrom / Polyethylen), die an periprotektischer Osteolyse litten [265]. Immunhistochemisch machten dabei die NK - Zellen einen Anteil von 30% der CD 45 - positiven Zellen aus. Dies zeigt eine nicht unwesentliche Beteiligung dieser Zelllinie an inflammatorischen Prozessen im Gelenk, zudem die Arbeitsgruppe ähnliche Werte bei Patienten mit Osteoarthritis feststellen konnte.

Lin et al. konnten *in vitro* eine proinflammatorische Zytokinexpression von NK - und dendritischen Zellen als Reaktion auf UHMWPE - Partikel nachweisen und schlussfolgerten so, dass diese Zellen auch an dem Prozess der periprotektischen Osteolyse beteiligt sind [264]. Für Kim et al. nehmen NK - Zellen eine unverzichtbare Rolle im Inflamationsprozess bei Gelenken ein [266]. NK - Zellen induzieren eine Gelenkentzündung durch Sezernierung von Interleukin - 4 und IFN - γ (Interferon - gamma). Diese unterdrücken in der Synovia die Produktion von TGF - β 1 (Transforming Growth Factor beta 1), ein Zytokin, das andere proinflammatorische Zytokine inhibiert. Inwiefern NK - Zellen spezifisch auf Metallpartikel oder -ionen reagieren, ist unklar, aber eine Wahrscheinlichkeit besteht, dass es sich bei den von uns detektierten CD 45 - positiven Zellen um NK - Zellen handelt. So bietet sich auch hier an, in Folgestudien NK - Zellen im Gewebe zu berücksichtigen und deren Anwesenheit mit einem spezifischen Marker zu verifizieren.

Weitere mögliche CD 45 - positive Zellen in unserer Studie sind dendritische oder B - Zellen. Ogunwale et al. untersuchten *in vitro* die Proliferation und Lebensfähigkeit von dendritischen Zellen und Lymphozyten, welche CoCr - Partikeln ausgesetzt wurden [267]. Sowohl dendritische als auch B - Zellen zeigten keine Proliferation oder Aktivierung.

Lin et al. konnten eine Steigerung der Zytokinproduktion von NK - Zellen auf UHMWPE - Partikel nachweisen, wenn zusätzlich dendritische Zellen in der Kultur zugefügt wurden [264]. Dendritische Zellen könnten eine Rolle im Inflamationsprozess spielen, welche in weiteren Studien berücksichtigt werden sollte.

Die Schlüsselzellen der Inflammation im Rahmen der aseptischen Prothesenlockerung sind allen voran die Makrophagen. Sehr viele Studien zeigen, dass diese als Hauptakteure des angeborenen Immunsystems, die Initiatoren in der Bekämpfung des Prothesenabriebs sind und eine Schlüsselrolle in der Initiierung der periprothetischen Entzündungsreaktion spielen [82, 246, 268]. Sie bilden als Typ - A - Synoviozyten einen Teil der Synovialmembran [269] und stellen bei aseptisch gelockerten Implantaten mit einem Anteil von 60 - 80% die dominierenden Zellen im periprothetischen Gewebe dar [270]. Treffen diese auf Abriebpartikel mit einer verdaulichen Größe ($< 10 \mu\text{m}$) [2] phagozytieren sie die Partikel und setzen unmittelbar proinflammatorische Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$, IL - 1β und IL - 6 frei [67, 231]. Welche Bedeutung Makrophagen und vor allem ihre Zytokinexpression für die partikelinduzierte Inflammation haben zeigen auch Ren et al in einem murinen Air - pouch - Modell [206]. Nach Partikelinjektion depletierte die Arbeitsgruppe Makrophagen mit einer Bisphosphonat - Injektion (Clodronat). Die Makrophagen wurden nach Phagozytose der Clodronat - Liposomen zerstört und so die Expression von IL - 1β und $\text{TNF}\alpha$ deutlich abgeschwächt. Die partikelinduzierte Inflamationsreaktion mit folgendem osteolytischem Potenzial wurde so signifikant reduziert. Eine weitere klinische Studie überprüfte so die Wirksamkeit von Clodronat bei Patienten mit rheumatoider Arthritis [271]. Eine Einmalinjektion reduzierte signifikant die Anzahl der CD 68 - positiven Zellen und bewahrte das Gelenk vor resorptiven Prozessen.

Wooley et al. nutzten ein murines Air - pouch - Modell und verglichen die inflammatorische Antwort verschiedener Partikel aus PMMA (Polymethylmethacrylat), Titan, UHMWPE und Cobalt - Chrom [53]. Dabei konnten sie bei allen Partikeln im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS) eine signifikante Zunahme der Makrophagen nach Partikelkontakt feststellen, als auch einen signifikanten Anstieg von IL - 1β und IL - 6. Metall - Ionen wurden hierbei allerdings nicht getestet.

Um die Makrophagenanzahl in unserer Studie immunhistochemisch zu verifizieren, nutzten wir einen CD 68 - Antikörper, der spezifisch für diesen Zelltyp ist [272]. Sehr eindrücklich zeigte sich dabei eine massive Makrophagenanzahl in der MP - Gruppe der linken Kniegelenke [208]. Die von uns injizierten Metallpartikel entsprachen in Form, Größe und Zusammensetzung weitestgehend Partikeln, wie sie bei menschlichen MoM - Prothesenträgern generiert werden [68, 242, 273] und reflektieren daher gut die dadurch verursachte Reaktion auf Zellebene [208].

Die Erwartung in der NegKo - und PBS - Gruppe keine signifikante Makrophagenzahl zu finden, wurde dabei bestätigt [208]. Ebenso die Hypothese, dass der Vorgang der Injektion einer sterilen PBS - Lösung selbst keine Entzündungsreaktion hervorruft, wurde mit dem Fehlen von immunkompetenten Zellen verifiziert [208].

In der MI - Gruppe zeigte sich kein signifikanter Anstieg CD 68 - positiver Zellen (Makrophagen) [208]. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die Ionen nach intraartikulärer Injektion stärker einer systemischen Verteilung unterlagen als es bei Partikeln der Fall ist [208]. Diese Annahme der systemischen Verteilung, wird unterstützt durch die Beobachtung von Patienten mit gelockerten MoM - Prothesen, welche durch hohe Cobalt - Ionen - Konzentrationen im Serum auffielen [274-276]. Cobalt - Ionen unterliegen eher einer systemischen Verteilung als Chrom - Ionen. Letztere tendieren dazu, stabile Komplexe zu formen und sich im Gewebe um das Implantat abzulagern [248, 277]. Trotzdem können beide Metallionen ein hohes Bindungsbestreben zu körpereigenen Proteinen zeigen [143, 278-281], welche so über die Blutzirkulation verteilt werden. Des Weiteren bekräftigen diese Annahme Studien, welche Revisionsgewebe von Patienten mit aseptischer Hüftprothesenlockerung untersuchten und neben der Sichtung eines hohen Partikelabriebvolumens lokal, vor allem erhöhte Ionenkonzentrationen von Cobalt und Chrom im Serum und weniger in der Synovialflüssigkeit feststellen konnten [44-47, 148]. Es wird neben einer Erhöhung der Ionenkonzentration im Serum und teilweise auch Urin, über eine Verteilung bis in entfernt liegende Organe, wie Leber, Lymphknoten und Milz berichtet [46, 154]. Unterstützt wird auch das Ausbleiben eines signifikanten Anstiegs der Makrophagenzahl in unserer MI - Gruppe durch kongruente Ergebnisse für TNF α (jeweils $p > 0,05$), IL - 1 β (jeweils $p > 0,05$) und IL - 6 (jeweils $p > 0,05$). Eine signifikante Expression dieser Zytokintriade blieb in der MI - Gruppe für die Makrophagen als hauptsächliche Produzenten aus [208].

Was allerdings gegen eine systemische Verteilung der Metallionen spricht, ist die Reaktivität der MI - Gruppe auf den CD 45 - Antikörper, da es in dieser Gruppe nach Metallionen - Injektion zu einem positiven Färbeergebnis in der Immunhistochemie kam [208].

Um welche Zellpopulationen es sich hierbei handelte, ist weiterhin spekulativ. Dennoch spricht dieses Ergebnis weniger für eine Umverteilung der Ionen und lässt vermuten, dass Makrophagen sich auf Metallpartikel reaktiver zeigen als auf Metallionen. Möglich ist allerdings auch, dass es zu einer gewissen Umverteilung der Ionen kam und der Metallionengehalt am untersuchten Gewebe für eine entsprechende Reaktion nicht ausreichte [208].

Makrophagen sprechen nämlich durchaus auf Metallionen an, wie es in einigen *in - vitro* - Versuchen bereits demonstriert wurde und diese in einer dosis- und zeitabhängigen Reaktion proinflammatorische Zytokine wie IL - 1 β und TNF α freisetzen [140, 141, 282], wobei eine dosisabhängige Reaktion wieder für unsere Annahme spricht, dass nach Umverteilung der Ionen eine zu niedrige Konzentration vor Ort lag.

Caicedo et al. testete *in - vitro* die Reaktion von humanen Monozyten/Makrophagen auf CoCr - Partikel und -Ionen [231]. Dabei konnten sie ähnlich ausgeprägte Zytokinexpressionen von IL - 1 β , TNF α und IL - 6 feststellen. Zusätzlich provozierten die Ionen stärker als die Partikel eine Expression von T - Zell - stimulierenden Oberflächenmolekülen. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Jonitz - Heincke et al., die humane Osteoblasten und PBMC's (peripheral blood mononuclear cell) einzeln und in Co - Kultur einer Ionenlösung von CoCr₂₉Mo₆ aussetzten in der gleichen Konzentration, wie wir es verabreichten (200 μ g/L) [283]. Dabei differenzierten sich die mononukleären Zellen ioneninduziert zu Makrophagen. Dieser Effekt war unter den Bedingungen der Co - Kultivierung sogar stärker ausgeprägt.

Die Arbeitsgruppe verdeutlichte dabei aber auch, dass *in - vitro* - Versuche anhand einzelner Zelllinien sehr statisch sind und sich wohl bessere Ergebnisse mit Co -Kulturen erzielen lassen [283]. Je mehr Zelllinien untereinander reagieren können, desto besser können die Ergebnisse auf die *in - vivo* - Situation übertragen werden. Das Zusammenspiel vieler Zellen und Gewebe in unserem synovialen Inflammationsmodell macht es schwierig, eine Aussage darüber zu treffen, warum die Metallionen hier keine Reaktion durch Makrophagen hervorgerufen haben und unsere Ergebnisse widersprüchlich zu oben genannten *in - vitro* - Experimenten sind. Dabei zeigen auch *in - vitro* - Versuche, dass oft Reaktionen auf Metallionen zeit - und dosisabhängig waren [244, 284].

Hier könnte also der Faktor Zeit nicht ausgereicht haben oder die Ionendosis für eine *in - vivo* - Situation doch zu gering gewesen zu sein, als dass Makrophagen darauf hätten ansprechen können.

Eine signifikante Anzahl CD 68 - positiver Zellen und damit Makrophagen fanden wir ausschließlich in der MP - Gruppe der linken, behandelten Kniegelenke ($p < 0,05$) [208]. Eine Makrophagenzunahme im Sinne einer systemischen Reaktion konnten wir in den rechten, unbehandelten Kniegelenken nicht feststellen [208]. Eine mögliche Ursache, weshalb die stärkste Reaktion in der MP - Gruppe von den Makrophagen ausging, kann zum einen daran liegen, dass lokalisierte Partikel in ihrer Dauerpräsenz Makrophagen stetig aktivieren und diesen Vorgang weiter unterhalten [208]. Zum anderen kann die

inflammatorische Antwort in der Partikelumgebung verstärkt werden, durch die Bildung von Fremdkörper - Riesenzellen um größere Partikel herum, wodurch es zur Freisetzung zersetzender Enzyme und Sauerstoffradikale kommt, welche sowohl den Zelltod [123] provozieren als auch den Materialabbau [121, 122] und zusätzlich Metallionen frei werden [285].

Für die Überprüfung des inflammatorischen Potenzials der Partikel als auch Ionen, nutzten wir immunhistochemische Marker für TNF α , IL - 1 β und IL - 6 [208].

In vielen *in vitro* - [141, 219, 231, 286] als auch *in vivo* - Studien [53, 287, 288] konnte die verstärkte Expression dieser Zytokine als Reaktion auf Abriebpartikel nachgewiesen werden.

Wie wichtig TNF α als Initiator in der partikelinduzierten Inflammation ist, wird vor allem bei Studien deutlich, die genetisch oder pharmakologisch dessen Signalkaskade inhibieren und erfolgreich die Entzündungsreaktion mit folgender Osteolyse eindämmen [289-291]. Für Stea et al. korrelierte die Schwere der Osteolyse mit der Höhe der TNF α - Werte im periprothetischen Gewebe [179]. Anhand eines murinen Schädelkalottenmodells konnte durch eine genetische Blockade der TNF α - Signalwege eine Inflammation unterdrückt und dadurch folgende osteolytische Prozesse verhindert werden [290]. Desweiteren zeigen Polymorphismen in der TNF α - Promoterregion eine erhöhte Assoziation zur aseptischen Prothesenlockerung [292].

IL - 1 β wird wie TNF α im Prozess der aseptischen Prothesenlockerung verstärkt exprimiert [179, 293]. Dies konnte sowohl in *in vitro* - [231] als auch *in vivo* - Studien [53] beobachtet werden.

Wie wichtig IL - 1 in der Signaltransduktion ist, zeigt sich auch in einem *in vivo* - Mausmodell von Epstein et al., welche intramedullär in den Femur Titanpartikel einbrachten, bei Mäusen, denen vorweg auf Genebene der IL - 1 - Rezeptor blockiert wurde und sie damit signifikant die gesamte partikelinduzierte Inflammation senken konnten [294].

Ebenso wird IL - 6 im Rahmen der aseptischen Prothesenlockerung verstärkt exprimiert [179] und zeigt sich im Revisionsgewebe von Hüftprothesen erhöht [295]. Gordon et al. stellten zudem eine positive Korrelation eines Polymorphismus im IL - 6 - Gen zu einer erhöhten Osteolysegefahr nach endoprothetischem Hüftersatz fest [296].

Im Prozess der aseptischen Prothesenlockerung sind daher alle drei Zytokine wesentlicher Bestandteil in der Initiierung der Entzündungskaskade [179, 293, 295].

In dieser Arbeit konnten wir überwiegend in der MP - Gruppe eine signifikant hohe Expression proinflammatorischer Zytokine feststellen ($p < 0,05$) [208]. Dieses Ergebnis stimmt zudem mit der signifikant hohen Makrophagenzahl überein ($p < 0,05$) [208], welche als wesentliche Produzenten dieser Zytokine gelten [62, 95, 184]. In der MI - Gruppe konnten wir hinsichtlich der Zytokine keine Signifikanz feststellen ($p > 0,05$) [208].

Demgegenüber zeigen allerdings *in vitro* - Versuche einen metallioneninduzierten Zytokinanstieg von $\text{TNF}\alpha$, IL - 1 β und IL - 6 [231, 286]. Niki et al. bspw. beobachteten anhand Zellkulturen mit Synoviozyten und Makrophagen die verstärkte Freisetzung von $\text{TNF}\alpha$, IL - 1 β und IL - 6 als Reaktion auf Cobalt- und Chrom - Ionen [286]. Eine Steigerung der Ionenkonzentration führte dabei zu einem Anstieg dieser Entzündungsmediatoren [286]. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Posada et al. anhand makrophagenähnlicher Zellkulturen, wobei vor allem ein IL - 6 - Anstieg beobachtet werden konnte, wenn den mit Metallpartikeln exponierten Zellen zusätzlich Cobalt - Ionen hinzugefügt wurde [248]. Für diese Arbeitsgruppe scheinen Cobalt - Ionen wesentliche Triggerfaktoren der Inflammation zu sein und wirken synergistisch zu Metallpartikeln.

In vivo konnten wir in der MI - Gruppe der linken, behandelten Knie keinen signifikanten Anstieg proinflammatorischer Zytokine feststellen ($p > 0,05$) [208]. Dieses Ergebnis ist kongruent mit dem Fehlen einer wesentlichen Makrophagenzahl innerhalb dieser Gruppe, welche als Hauptproduzenten dieser Zytokine gelten [62, 95, 184].

Interessanterweise zeigte sich bei den unbehandelten, rechten Kniegelenken der MP - Gruppe die Expression von $\text{TNF}\alpha$ und IL - 1 β in der synovialen Membran signifikant erhöht als mögliches Zeichen einer systemischen Inflammation ($p < 0,05$) [208].

Eine IL - 6 - Expression hingegen konnten wir nicht feststellen ($p > 0,05$) [208]. Möglicherweise erklärt hierbei ein zeitlicher Faktor das Ausbleiben dieser Expression. IL - 6 wird vor allem unter dem Einfluss von $\text{TNF}\alpha$ und IL - 1 β produziert [186, 294, 297], welche sich bereits positiv in unseren Ergebnissen zeigten [208]. Epstein et al. sowie Kaufman et al. verdeutlichen in ihren Studien, dass der IL - 6 Sezernierung in der periprothetischen Membran erst eine Expression von $\text{TNF}\alpha$ und IL - 1 β vorausgehen muss [294, 298]. In der Synovia der rechten Kniegelenke fand also bereits eine beginnende Inflamationsreaktion mit $\text{TNF}\alpha$ und IL - 1 β als Ausdruck dieser statt und daher ist anzunehmen, dass IL - 6 höchstwahrscheinlich im weiteren Verlauf auch hätte detektiert werden können [208].

Diese Ergebnisse in den rechten, unbehandelten Kniegelenken, lassen eine systemische Inflamationsreaktion auf Metallpartikel vermuten [208]. Dieser Gedanke wird auch durch die Arbeitsgruppe Ren et al. bekräftigt, die eine Abnahme der Knochendichte im kontralateralen, unbehandelten Femur beobachten konnten, nachdem eine kontinuierliche Infusion von UHMWPE - Partikeln in den femoralen Markraum von Mäusen erfolgte [55]. Eine systemische Ausbreitung der metallpartikelinduzierten Inflammation bis in entfernt liegendes Gewebe erscheint daher durchaus denkbar, bedarf aber in Zukunft sicherlich noch weiteren Untersuchungen, wobei Untersuchungen hinsichtlich einer Inflammation von anderen Organen wie Leber, Milz und Niere eine Rolle spielen [208].

In dieser Arbeit stießen wir auf gewisse Limitationen.

Bei der Begutachtung unserer murinen Knieschnittbilder unter dem digitalen Mikroskop, fiel vor allem in der MP - Gruppe eine deutliche Dickenzunahme der Synovia und des umgebenden Weichgewebes auf. Die beobachtete Massenzunahme des Weichgewebes spricht hier allerdings bei fehlendem Nachweis von CD 3 positiven Zellen nicht für einen Pseudotumor. Pseudotumoren liegen lymphozytäre Infiltrationen zugrunde [131, 245], CD 3 wird überwiegend auf Lymphozyten exprimiert [62] und diese konnten wir nicht nachweisen [208].

Immunhistochemisch zeigte sich die Massenzunahme jedoch übereinstimmend mit einer Makrophageninfiltration. Unter der Annahme, dass es sich hier sowohl um eine dosisabhängige als auch zellspezifische Reaktion handelt, werden durch die Beobachtungen der Arbeitsgruppe Lohmann et al. unterstützt, welche bei niedrigem Metallgehalt im Revisionsgewebe eine unspezifische, überwiegend durch Makrophagen vermittelte Reaktion feststellen konnten, hingegen dominierten bei sehr hohem Metallgehalt Lymphozyten die Antwort [299].

Angelehnt an diese Ergebnisse würden weitere Untersuchungen mit unterschiedlichen Metallpartikelkonzentrationen Sinn machen, inwieweit dosisabhängige Unterschiede in der Gewebereaktion zum Ausdruck kommen [208].

Eine weitere Limitation unseres Studiendesigns stellt die Einzelapplikation einer Werkstoffsuspension dar und weicht von dem klinisch relevanten Punkt der kontinuierlichen Abrieberzeugung eines Prothesenträgers ab [208].

Ren et al. begegneten dieser Limitierung mit einer Pumpe, die der Maus subkutan, intrascapulär implantiert wurde und kontinuierlich über einen Zeitraum von 3 Wochen Polyethylenpartikel in den Femurmarkraum applizierte [55]. Mittels histologischer, immunhistochemischer und Mikro - CT - Untersuchungen konnten sie dabei partikel-

induzierte Osteolysen am Knochen feststellen [55]. Vorteilhaft an diesem Modell ist sicherlich die kontinuierliche Infusion von Abriebpartikeln und gleicht eher dem klinischen Szenario. Das Modell eignete sich gut zur Darstellung der überschießenden Knochenresorption, aber der Bezug zum Zellmilieu im Gelenk fehlt.

Zudem geht aus der Studie von Ren et al. [55] nicht klar hervor, wie und ob eine Gewährleistung stattfand, dass die Partikel auch wirklich kontinuierlich an den vorgesehenen Ort appliziert wurden und ob das Pumpensystem in diesen Größenverhältnissen stets die gleiche Dosis verabreichte und fehlerfrei arbeitete. Dazu ist aber nicht außer Acht zu lassen, dass der Prozess der aseptischen Osteolyse beim menschlichen Prothesenträger über Jahrzehnte dauert. Das wiederum könnte die Relativierung der Einmalapplikation zu einer Kontinuierlichen bedeuten, bei einer von uns gewählten Inkubationszeit von 7 Tagen.

Zuletzt stellt diese Arbeit die primäre Entzündungsreaktion auf Partikel und Ionen dar und geht dem Osteolyseprozess voraus, der selbst an diesem Modell nicht nachvollzogen werden kann [208]. Das heißt, dass nur ein Teilprozess der aseptischen Prothesenlockerung belichtet wurde, aber dieser einen wichtigen Ausgangspunkt darstellt um nachgeschaltete Prozesse besser zu verstehen und weitere Projekte darüber zu etablieren.

8 Zusammenfassung

Das Ziel dieser Studie war die Untersuchung der primären Entzündungsreaktion auf Metallabrieb. Hintergrund der Arbeit sind die aseptische Prothesenlockerung und die pathologischen Weichteilreaktionen, welche in ihrem Ausmaß auf Metallabrieb zurückgeführt werden.

Die Grundlage der primären Entzündungsreaktion besteht aus einem Zusammenspiel verschiedener immunkompetenter Zellpopulationen und deren proinflammatorische Zytokine. Mittels Immunhistochemie konnte dargestellt werden, dass sowohl Metallpartikel als auch -ionen befähigt sind, Entzündungsreaktionen auszulösen und diese in unterschiedlicher Ausprägung.

Metallionen nahmen Einfluss auf die Rekrutierung immunkompetenter, CD 45 - positiver Zellen und weniger auf Makrophagen oder Zytokine. Die stärkste inflammatorische Gewebeantwort ging von CoCrMo - Partikeln aus, mit einer deutlich hohen Beteiligung an Makrophagen und entsprechender Zytokinsekretion ($\text{TNF}\alpha$, IL - 1 β , IL - 6).

Lymphozyten zeigten sich weder auf Metallpartikeln noch Metallionen reaktiv.

Des Weiteren konnte eine systemische Inflamationsreaktion an den unbehandelten, rechten Kniegelenken festgestellt werden.

9 Anhang

Statistik linke Knie

Gruppe			TNFa	IL6	IL1b	CD68	CD45	CD3
PBS	N	Gültig	10	10	10	10	10	10
		Fehlend	0	0	0	0	0	0
	Mittelwert		2,5575	5,1245	1,2400	16,6798	4,6850	,0771
	Median		3,1875	5,5167	1,0000	14,6458	4,7143	,0000
	Standardabweichung		1,50907	3,19246	1,08830	10,41047	2,26853	,18470
	Minimum		,00	,75	,00	3,00	,50	,00
	Maximum		4,50	9,40	3,33	32,00	8,25	,57
	Perzentile	25	1,2833	1,6250	,3000	8,4107	3,3250	,0000
		50	3,1875	5,5167	1,0000	14,6458	4,7143	,0000
		75	3,6167	7,7714	2,1000	27,0938	6,2143	,0500
MI	N	Gültig	10	10	10	10	10	10
		Fehlend	0	0	0	0	0	0
	Mittelwert		19,6123	13,0204	3,6298	20,9086	32,4458	,0292
	Median		15,6500	13,2917	3,3214	22,0536	30,2500	,0000
	Standardabweichung		11,90116	4,44516	2,47792	9,75258	9,81401	,06227
	Minimum		4,83	5,40	,50	6,60	22,50	,00
	Maximum		45,50	19,00	8,00	35,29	47,60	,17
	Perzentile	25	11,5357	8,5000	1,5000	9,9375	23,2396	,0000
		50	15,6500	13,2917	3,3214	22,0536	30,2500	,0000
		75	26,5438	17,1071	5,8125	29,0655	43,5250	,0313
MP	N	Gültig	10	10	10	10	10	10
		Fehlend	0	0	0	0	0	0
	Mittelwert		240,6164	96,3043	66,4389	195,8405	115,1233	,1135
	Median		139,6345	69,7375	17,6667	159,8000	101,5333	,1339
	Standardabweichung		186,93564	75,18357	77,85935	122,97666	97,33568	,10546
	Minimum		67,33	48,00	4,71	65,60	12,40	,00
	Maximum		500,86	294,50	203,00	387,11	297,50	,25
	Perzentile	25	86,5417	54,2778	10,3598	76,9583	25,3500	,0000
		50	139,6345	69,7375	17,6667	159,8000	101,5333	,1339
		75	479,5750	104,1429	133,6042	337,9286	182,0000	,2125
NegKo	N	Gültig	5	5	5	5	5	2
		Fehlend	0	0	0	0	0	3
	Mittelwert		2,0144	6,6071	1,0717	17,4333	3,0143	,0000
	Median		1,6000	6,2500	,4000	15,3333	3,1000	,0000
	Standardabweichung		1,31520	3,50946	1,29729	10,54659	1,81628	,00000
	Minimum		,67	3,00	,25	5,83	,50	,00
	Maximum		3,56	11,00	3,33	34,67	5,50	,00
	Perzentile	25	,8333	3,2500	,3125	10,1667	1,4500	,0000

	50	1,6000	6,2500	,4000	15,3333	3,1000	,0000
	75	3,4028	10,1429	2,1667	25,7500	4,5357	,0000

Tab. 8 zeigt die statistische Analyse der quantitativen Auswertung der positiven Zellen in den linken murinen Kniegelenken der jeweiligen Versuchsgruppen

		Statistik rechte Knie					
		TNF α	IL6	IL1b	CD68	CD45	CD3
N	Gültig	27	29	32	27	35	26
	Fehlend	8	6	3	8	0	9
Mittelwert		10,2361	7,0044	2,3446	17,1721	4,9272	,0815
Median		3,5556	4,2500	1,6190	14,0000	3,3333	,0000
Standardabweichung		11,54883	7,13156	2,73429	11,34896	4,37797	,12977
Minimum		,67	,50	,00	4,50	,00	,00
Maximum		38,33	37,00	11,67	54,50	16,00	,50
Perzentile	25	2,8000	2,8750	,5000	10,2500	1,8000	,0000
	50	3,5556	4,2500	1,6190	14,0000	3,3333	,0000
	75	19,1667	9,3929	2,9500	20,0000	7,6667	,2000

Tab. 9 zeigt die statistische Analyse der quantitativen Auswertung der positiven Zellen in den rechten murinen Kniegelenken der jeweiligen Versuchsgruppen

10 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 zeigt den histologischen Aufbau eines Gelenkes. Dargestellt sind u.a. die Gelenkkapsel mit der äußeren Membrana fibrosa und der inneren Membrana synovialis mit A- und B-Synoviazysten sowie das subintimale Gewebe mit Blutgefäßen und Fettzellen [1].....10

Abb. 2 zeigt eine Variante der indirekten Immunhistochemie, die Polymer - Methode [216].....26

Abb. 3 (basierend auf Cheng X., Dirmeier S.C. et al., 2020 [208]) zeigt die statistisch signifikante Überexpression von TNF α - positiven Zellen der MP-Gruppe im linken murinen Synovialgewebe gegenüber der PBS- und NegKo-Gruppe ($p < 0,05$) [208] ..36

Abb. 4 - 8 zeigen jeweils das Synovialgewebe der linken murinen Kniegelenke der einzelnen Versuchsgruppen (PBS-, MP-, MI-, PE - Gruppe) sowie der NegKo - Gruppe in immunhistochemischer Anfärbung mit TNF α - Antikörpern.....36 - 38

Abb. 9 (basierend auf Cheng X., Dirmeier S.C. et al., 2020 [208]) zeigt die statistisch signifikante Überexpression von IL - 6 - positiven Zellen der MP - Gruppe im linken murinen Synovialgewebe gegenüber der PBS - und der NegKo - Gruppe ($p < 0,05$) [208].....	39
Abb. 10 - 13 zeigen jeweils das Synovialgewebe der linken murinen Kniegelenke der einzelnen Versuchsgruppen (PBS-, MP-, MI - Gruppe) sowie der NegKo - Gruppe in immunhistochemischer Anfärbung mit IL - 6 - Antikörpern.....	39 - 40
Abb. 14 (basierend auf Cheng X., Dirmeier S.C. et al., 2020 [208]) zeigt die statistisch signifikante Überexpression von IL - 1 β - positiven Zellen der MP - Gruppe im linken murinen Synovialgewebe gegenüber der PBS- und der NegKo - Gruppe ($p < 0,05$) [208].....	41
Abb. 15 - 18 zeigen jeweils das Synovialgewebe der linken murinen Kniegelenke der einzelnen Versuchsgruppen (PBS-, MP-, MI - Gruppe) sowie der NegKo - Gruppe in immunhistochemischer Anfärbung mit IL - 1 β - Antikörpern.....	42 - 43
Abb. 19 (basierend auf Cheng X., Dirmeier S.C. et al., 2020 [208]) zeigt die statistisch signifikante Überexpression von CD 68 - positiven Zellen der MP - Gruppe der linken murinen Synovialgewebe gegenüber der PBS-, NegKo- und MI - Gruppe ($p < 0,05$) [208].....	44
Abb. 20 - 23 zeigen jeweils das Synovialgewebe der linken murinen Kniegelenke der einzelnen Versuchsgruppen (PBS-, MP-, MI - Gruppe) sowie der NegKo - Gruppe in immunhistochemischer Anfärbung mit CD 68 - Antikörpern.....	44 - 46
Abb. 24 (basierend auf Cheng X., Dirmeier S.C. et al., 2020 [208]) zeigt die statistisch signifikante Überexpression von CD 45 - positiven Zellen der MP - Gruppe im linken murinen Synovialgewebe gegenüber der PBS- und der NegKo-Gruppe ($p < 0,05$) [208] sowie der MI- gegenüber der PBS - Gruppe ($p < 0,05$) [208].....	47
Abb. 25 - 28 zeigen jeweils das Synovialgewebe der linken murinen Kniegelenke der einzelnen Versuchsgruppen (PBS-, MP-, MI - Gruppe) sowie der NegKo - Gruppe in immunhistochemischer Anfärbung mit CD 45 - Antikörpern.....	47 - 49
Abb. 29 (basierend auf Cheng X., Dirmeier S.C. et al., 2020 [208]) zeigt keine statistisch signifikante Überexpression CD 3 - positiver Zellen in allen Gruppen im direkten Vergleich.....	50
Abb. 30 - 33 zeigen jeweils das Synovialgewebe der linken murinen Kniegelenke der einzelnen Versuchsgruppen (PBS-, MP-, MI - Gruppe) sowie der NegKo - Gruppe in immunhistochemischer Anfärbung mit CD 3 - Antikörpern.....	50 - 51
Abb. 34 (basierend auf Cheng X., Dirmeier S.C. et al., 2020 [208]) zeigt die Überexpression TNF α - positiver Zellen im Synovialgewebe der rechten murinen (unbehandelten) Kniegelenke im Gruppenvergleich. Dabei statistisch signifikante Erhöhung in der MP - Gruppe [208].....	52

Abb. 35 - 37 zeigen jeweils das Synovialgewebe der rechten murinen Kniegelenke der einzelnen Versuchsgruppen (PBS-, MP-, MI - Gruppe) in immunhistochemischer Anfärbung mit TNF α - Antikörpern.....	53 - 54
Abb. 38 (basierend auf Cheng X., Dirmeier S.C. et al., 2020 [208]) zeigt die Expression IL - 6 - positiver Zellen im Synovialgewebe der rechten murinen (unbehandelten) Kniegelenke ohne statistisch signifikante Ergebnisse [208].....	54
Abb. 39 - 41 zeigen jeweils das Synovialgewebe der rechten murinen Kniegelenke der einzelnen Versuchsgruppen (PBS-, MP-, MI - Gruppe) in immunhistochemischer Anfärbung mit IL - 6 - Antikörpern.....	55 - 56
Abb. 42 (basierend auf Cheng X., Dirmeier S.C. et al., 2020 [208]) zeigt die Überexpression IL - 1 β - positiver Zellen im Synovialgewebe der rechten murinen Kniegelenke. Dabei statistisch signifikante Erhöhung in der MP - Gruppe [208].....	57
Abb. 43 - 45 zeigen jeweils das Synovialgewebe der rechten murinen Kniegelenke der einzelnen Versuchsgruppen (PBS-, MP-, MI - Gruppe) in immunhistochemischer Anfärbung mit IL - 1 β - Antikörpern.....	57 - 58
Abb. 46 (basierend auf Cheng X., Dirmeier S.C. et al., 2020 [208]) zeigt die Expression CD 68 - positiver Zellen im Synovialgewebe der rechten murinen Kniegelenke ohne statistisch signifikante Ergebnisse [208].....	59
Abb. 47 - 49 zeigen jeweils das Synovialgewebe der rechten murinen Kniegelenke der einzelnen Versuchsgruppen (PBS-, MP-, MI - Gruppe) in immunhistochemischer Anfärbung mit CD 68 - Antikörpern.....	59 - 60
Abb. 50 (basierend auf Cheng X., Dirmeier S.C. et al., 2020 [208]) zeigt die Überexpression CD 45 - positiver Zellen im Synovialgewebe der rechten murinen Kniegelenke. Dabei statistisch signifikante Erhöhung in der MI - Gruppe gegenüber allen anderen Gruppen [208].....	61
Abb. 51 - 53 zeigen jeweils das Synovialgewebe der rechten murinen Kniegelenke der einzelnen Versuchsgruppen (PBS-, MP-, MI - Gruppe) in immunhistochemischer Anfärbung mit CD 45 - Antikörpern.....	61 - 62
Abb. 54 (basierend auf Cheng X., Dirmeier S.C. et al., 2020 [208]) zeigt die Expression CD 3 - positiver Zellen im Synovialgewebe der rechten murinen Kniegelenke ohne statistisch signifikante Ergebnisse [208].....	63
Abb. 55 - 57 zeigen jeweils das Synovialgewebe der rechten murinen Kniegelenke der einzelnen Versuchsgruppen (PBS-, MP-, MI - Gruppe) in immunhistochemischer Anfärbung mit CD 3 - Antikörpern.....	63 - 64

11 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Positivgewebe für spezifische Primärantikörper	27
Tab. 2	Verdünnung der Primärantikörper, Endkonzentration	28
Tab. 3	Geräteliste für Gewebepvorbereitung und Immunhistochemie.....	30
Tab. 4	Verbrauchsmaterialien Gewebepvorbereitung und Immunhistochemie	32
Tab. 5	Reagenzien für Gewebepvorbereitung und Immunhistochemie	33
Tab. 6	Antikörper für Immunhistochemie	34
Tab. 7	Zubereitete Puffer und Lösungen zur Durchführung der Immunhistochemie ...	34
Tab. 8	zeigt die statistische Analyse der quantitativen Auswertung der positiven Zellen in den linken murinen Kniegelenken der jeweiligen Versuchsgruppen.....	80
Tab. 9	zeigt die statistische Analyse der quantitativen Auswertung der positiven Zellen in den rechten murinen Kniegelenken der jeweiligen Versuchsgruppen.....	81

12 Literaturverzeichnis

1. Deller, T. and U. Welsch, *Sobotta Lehrbuch Histologie: mit Zugang zur mediscript Lernwelt*. 2014: Urban & Fischer/Elsevier.
2. Suner, S., J. Tipper, and N. Emami, *Biological effects of wear particles generated in total joint replacements: trends and future prospects*. Tribology-Materials, Surfaces & Interfaces, 2012. **6**(2): p. 39-52.
3. Etkin, C.D. and B.D. Springer, *The American Joint Replacement Registry-the first 5 years*. Arthroplast Today, 2017. **3**(2): p. 67-69.
4. Bitar, D. and J. Parvizi, *Biological response to prosthetic debris*. World J Orthop, 2015. **6**(2): p. 172-89.
5. Learmonth, I.D., C. Young, and C. Rorabeck, *The operation of the century: total hip replacement*. Lancet, 2007. **370**(9597): p. 1508-19.
6. Institut für Qualitätssicherung und Transparenz im Gesundheitswesen (IQTIG), gemeinsamer Bundesausschuss, *Qualitätsreport 2019 zum Erfassungsjahr 2018*. 2019: p. 164.
7. Benazzo, F., et al., *Total knee replacement in acute and chronic traumatic events*. Injury, 2014. **45 Suppl 6**: p. S98-s104.
8. Ferguson, R.J., et al., *Hip replacement*. Lancet, 2018. **392**(10158): p. 1662-1671.
9. Polkowski, G.G., et al., *Total hip arthroplasty in the very young patient*. J Am Acad Orthop Surg, 2012. **20**(8): p. 487-97.
10. IQTIG - Institut für Qualitätssicherung und Transparenz im Gesundheitswesen, B., *Qualitätsreport 2019*.
11. Heisel, C., M. Silva, and T.P. Schmalzried, *Bearing surface options for total hip replacement in young patients*. Instr Course Lect, 2004. **53**: p. 49-65.

12. Granchi, D., et al., *Metal hypersensitivity testing in patients undergoing joint replacement: a systematic review*. J Bone Joint Surg Br, 2012. **94**(8): p. 1126-34.
13. Beck, R.T., K.D. Illingworth, and K.J. Saleh, *Review of periprosthetic osteolysis in total joint arthroplasty: an emphasis on host factors and future directions*. J Orthop Res, 2012. **30**(4): p. 541-6.
14. Drees, P., et al., *[Molecular pathways in aseptic loosening of orthopaedic endoprosthesis]*. Biomed Tech (Berl), 2008. **53**(3): p. 93-103.
15. Gallo, J., et al., *Particle disease: biologic mechanisms of periprosthetic osteolysis in total hip arthroplasty*. Innate Immun, 2013. **19**(2): p. 213-24.
16. Man, K., et al., *Immunological Responses to Total Hip Arthroplasty*. J Funct Biomater, 2017. **8**(3).
17. Harris, W.H., *Wear and periprosthetic osteolysis: the problem*. Clin Orthop Relat Res, 2001(393): p. 66-70.
18. Purdue, P.E., et al., *The cellular and molecular biology of periprosthetic osteolysis*. Clin Orthop Relat Res, 2007. **454**: p. 251-61.
19. Willert, H.G. and M. Semlitsch, *Reactions of the articular capsule to wear products of artificial joint prostheses*. J Biomed Mater Res, 1977. **11**(2): p. 157-64.
20. Morlock, M.M., N. Bishop, and C. Kaddick, *[Which hip articulation bearing for which patient? : Tribology of the future]*. Orthopade, 2011. **40**(12): p. 1061-7.
21. Massin, P., et al., *Does Biolox Delta ceramic reduce the rate of component fractures in total hip replacement?* Orthop Traumatol Surg Res, 2014. **100**(6 Suppl): p. S317-21.
22. Howard, D.P., et al., *Ceramic-on-ceramic bearing fractures in total hip arthroplasty: an analysis of data from the National Joint Registry*. Bone Joint J, 2017. **99-b**(8): p. 1012-1019.
23. Glaser, D., et al., *Clicking and squeaking: in vivo correlation of sound and separation for different bearing surfaces*. JBJS, 2008. **90**: p. 112-120.
24. Claes, L., et al., *AE-Manual der Endoprothetik: Hüfte und Hüftrevision*. 2011: Springer-Verlag.
25. Santavirta, S., et al., *Alternative materials to improve total hip replacement tribology*. Acta Orthop Scand, 2003. **74**(4): p. 380-8.
26. Heneghan, C., D. Langton, and M. Thompson, *Ongoing problems with metal-on-metal hip implants*. Bmj, 2012. **344**: p. e1349.
27. Amstutz, H.C. and M.J. Le Duff, *Hip resurfacing: history, current status, and future*. Hip Int, 2015. **25**(4): p. 330-8.
28. Sadoghi, P., et al., *Revision surgery after total joint arthroplasty: a complication-based analysis using worldwide arthroplasty registers*. J Arthroplasty, 2013. **28**(8): p. 1329-32.
29. Meyer, H., et al., *Corrosion at the cone/taper interface leads to failure of large-diameter metal-on-metal total hip arthroplasties*. Clin Orthop Relat Res, 2012. **470**(11): p. 3101-8.
30. Zijlstra, W.P., N. Bos, and J.J. van Raaij, *Large head metal-on-metal cementless total hip arthroplasty versus 28 mm metal-on-polyethylene cementless total hip arthroplasty: design of a randomized controlled trial*. BMC Musculoskelet Disord, 2008. **9**: p. 136.
31. Innmann, M.M., et al., *Minimum ten-year results of a 28-mm metal-on-metal bearing in cementless total hip arthroplasty in patients fifty years of age and younger*. Int Orthop, 2014. **38**(5): p. 929-34.
32. Pivec, R., et al., *Hip arthroplasty*. Lancet, 2012. **380**(9855): p. 1768-77.
33. Smith, T.M., et al., *Metal-on-metal total hip arthroplasty with large heads may prevent early dislocation*. Clin Orthop Relat Res, 2005. **441**: p. 137-42.
34. Amstutz, H.C. and P. Grigoris, *Metal on metal bearings in hip arthroplasty*. Clin Orthop Relat Res, 1996(329 Suppl): p. S11-34.
35. MacDonald, S.J., et al., *Metal-on-metal versus polyethylene in hip arthroplasty: a randomized clinical trial*. Clin Orthop Relat Res, 2003(406): p. 282-96.

36. Ellams, D., O. Forsyth, and A. Mistry, *National Joint Registry for England and Wales*. 7th annual report, 2010. **1450**(2009).
37. Drummond, J., P. Tran, and C. Fary, *Metal-on-Metal Hip Arthroplasty: A Review of Adverse Reactions and Patient Management*. J Funct Biomater, 2015. **6**(3): p. 486-99.
38. Smith, A.J., et al., *Failure rates of stemmed metal-on-metal hip replacements: analysis of data from the National Joint Registry of England and Wales*. Lancet, 2012. **379**(9822): p. 1199-204.
39. Buerger, M.L. and W.L. Walter, *Hip resurfacing arthroplasty: the Australian experience*. J Arthroplasty, 2007. **22**(7 Suppl 3): p. 61-5.
40. Langton, D.J., et al., *Accelerating failure rate of the ASR total hip replacement*. J Bone Joint Surg Br, 2011. **93**(8): p. 1011-6.
41. Matharu, G.S., H.G. Pandit, and D.W. Murray, *Poor Survivorship and Frequent Complications at a Median of 10 Years After Metal-on-Metal Hip Resurfacing Revision*. Clin Orthop Relat Res, 2017. **475**(2): p. 304-314.
42. Zenz, P., et al., *Ten-year follow-up of the non-porous Allofit cementless acetabular component*. J Bone Joint Surg Br, 2009. **91**(11): p. 1443-7.
43. Langton, D.J., et al., *Adverse reaction to metal debris following hip resurfacing: the influence of component type, orientation and volumetric wear*. J Bone Joint Surg Br, 2011. **93**(2): p. 164-71.
44. Brodner, W., et al., *Serum cobalt levels after metal-on-metal total hip arthroplasty*. J Bone Joint Surg Am, 2003. **85-a**(11): p. 2168-73.
45. Clarke, M.T., et al., *Levels of metal ions after small- and large-diameter metal-on-metal hip arthroplasty*. J Bone Joint Surg Br, 2003. **85**(6): p. 913-7.
46. Savarino, L., et al., *Ion release in patients with metal-on-metal hip bearings in total joint replacement: a comparison with metal-on-polyethylene bearings*. J Biomed Mater Res, 2002. **63**(5): p. 467-74.
47. MacDonald, S.J., et al., *Metal-on-metal versus polyethylene in hip arthroplasty: a randomized clinical trial*. Clinical Orthopaedics and Related Research®, 2003. **406**(1): p. 282-296.
48. Davda, K., et al., *An analysis of metal ion levels in the joint fluid of symptomatic patients with metal-on-metal hip replacements*. J Bone Joint Surg Br, 2011. **93**(6): p. 738-45.
49. Langton, D.J., et al., *Early failure of metal-on-metal bearings in hip resurfacing and large-diameter total hip replacement: A consequence of excess wear*. J Bone Joint Surg Br, 2010. **92**(1): p. 38-46.
50. Urban, R.M., et al., *Dissemination of wear particles to the liver, spleen, and abdominal lymph nodes of patients with hip or knee replacement*. J Bone Joint Surg Am, 2000. **82**(4): p. 457-76.
51. Dobbs, H.S. and M.J. Minski, *Metal ion release after total hip replacement*. Biomaterials, 1980. **1**(4): p. 193-8.
52. Sethi, R.K., et al., *Macrophage response to cross-linked and conventional UHMWPE*. Biomaterials, 2003. **24**(15): p. 2561-73.
53. Wooley, P.H., et al., *Inflammatory responses to orthopaedic biomaterials in the murine air pouch*. Biomaterials, 2002. **23**(2): p. 517-26.
54. Matthews, J.B., et al., *Comparison of the response of primary murine peritoneal macrophages and the U937 human histiocytic cell line to challenge with in vitro generated clinically relevant UHMWPE particles*. Biomed Mater Eng, 2000. **10**(3-4): p. 229-40.
55. Ren, P.G., et al., *Continuous infusion of UHMWPE particles induces increased bone macrophages and osteolysis*. Clin Orthop Relat Res, 2011. **469**(1): p. 113-22.
56. Franz, S., et al., *Immune responses to implants - a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials*. Biomaterials, 2011. **32**(28): p. 6692-709.

57. Ingham, E. and J. Fisher, *Biological reactions to wear debris in total joint replacement*. Proc Inst Mech Eng H, 2000. **214**(1): p. 21-37.
58. Hallab, N.J. and J.J. Jacobs, *Biologic effects of implant debris*. Bull NYU Hosp Jt Dis, 2009. **67**(2): p. 182-8.
59. Ingram, J., et al., *Comparison of the biological activity of grade GUR 1120 and GUR 415HP UHMWPE wear debris*. Biomed Mater Eng, 2002. **12**(2): p. 177-88.
60. Matthews, J.B., et al., *Evaluation of the response of primary human peripheral blood mononuclear phagocytes to challenge with in vitro generated clinically relevant UHMWPE particles of known size and dose*. J Biomed Mater Res, 2000. **52**(2): p. 296-307.
61. Purdue, P.E., et al., *The central role of wear debris in periprosthetic osteolysis*. Hss j, 2006. **2**(2): p. 102-13.
62. Vollmar, A., I. Zündorf, and T. Dingermann, *Immunologie: Grundlagen und Wirkstoffe; mit 216 Tabellen*. 2013: Wiss. Verlag-Ges.
63. Boyce, B.F., et al., *The osteoclast, bone remodelling and treatment of metabolic bone disease*. Eur J Clin Invest, 2012. **42**(12): p. 1332-41.
64. Kim, J.H., et al., *The mechanism of osteoclast differentiation induced by IL-1*. J Immunol, 2009. **183**(3): p. 1862-70.
65. Green, T.R., et al., *Effect of size and dose on bone resorption activity of macrophages by in vitro clinically relevant ultra high molecular weight polyethylene particles*. J Biomed Mater Res, 2000. **53**(5): p. 490-7.
66. Grosse, S., et al., *Wear particles and ions from cemented and uncemented titanium-based hip prostheses-a histological and chemical analysis of retrieval material*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2015. **103**(3): p. 709-17.
67. Ollivere, B., et al., *Current concepts in osteolysis*. J Bone Joint Surg Br, 2012. **94**(1): p. 10-5.
68. Doorn, P.F., et al., *Metal wear particle characterization from metal on metal total hip replacements: transmission electron microscopy study of periprosthetic tissues and isolated particles*. J Biomed Mater Res, 1998. **42**(1): p. 103-11.
69. Catelas, I., et al., *Flow cytometric analysis of macrophage response to ceramic and polyethylene particles: effects of size, concentration, and composition*. J Biomed Mater Res, 1998. **41**(4): p. 600-7.
70. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie*. 2009, Stuttgart: Thieme. XVII, 644 S. .:
71. Revell, P.A., *The combined role of wear particles, macrophages and lymphocytes in the loosening of total joint prostheses*. J R Soc Interface, 2008. **5**(28): p. 1263-78.
72. Landgraeber, S., et al., *The pathology of orthopedic implant failure is mediated by innate immune system cytokines*. Mediators Inflamm, 2014. **2014**: p. 185150.
73. Pajarinen, J., et al., *Particle disease really does exist*. Acta Orthop, 2018. **89**(1): p. 133-136.
74. Zysk, S.P., et al., *[Inflammatory responses to wear particles in vivo: a novel model in the murine knee joint]*. Orthopade, 2003. **32**(4): p. 305-11.
75. Zysk, S.P., et al., *Particles of all sizes provoke inflammatory responses in vivo*. Clin Orthop Relat Res, 2005(433): p. 258-64.
76. Zysk, S.P., et al., *Influence of orthopedic particulate biomaterials on inflammation and synovial microcirculation in the murine knee joint*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2004. **71**(1): p. 108-15.
77. Pap, T., et al., *Osteoclast-independent bone resorption by fibroblast-like cells*. Arthritis Res Ther, 2003. **5**(3): p. R163-73.
78. Morawietz, L., et al., *Proposal for a histopathological consensus classification of the periprosthetic interface membrane*. J Clin Pathol, 2006. **59**(6): p. 591-7.
79. Sukur, E., et al., *Particle Disease: A Current Review of the Biological Mechanisms in Periprosthetic Osteolysis After Hip Arthroplasty*. Open Orthop J, 2016. **10**: p. 241-51.

80. Krenn, V., et al., [*Supramacroparticulate polyethylene in inflammation of synovial-like interface membranes: Characterization and suggested nomenclature*]. *Orthopade*, 2016. **45**(3): p. 256-64.
81. Athanasou, N.A., *The pathobiology and pathology of aseptic implant failure*. *Bone Joint Res*, 2016. **5**(5): p. 162-8.
82. Ingham, E. and J. Fisher, *The role of macrophages in osteolysis of total joint replacement*. *Biomaterials*, 2005. **26**(11): p. 1271-86.
83. Jones, L.C., C. Frondoza, and D.S. Hungerford, *Immunohistochemical evaluation of interface membranes from failed cemented and uncemented acetabular components*. *J Biomed Mater Res*, 1999. **48**(6): p. 889-98.
84. Pap, G., et al., *Development and characteristics of a synovial-like interface membrane around cemented tibial hemiarthroplasties in a novel rat model of aseptic prosthesis loosening*. *Arthritis Rheum*, 2001. **44**(4): p. 956-63.
85. Bostrom, M. and R. O'Keefe, *What experimental approaches (eg, in vivo, in vitro, tissue retrieval) are effective in investigating the biologic effects of particles?* *J Am Acad Orthop Surg*, 2008. **16 Suppl 1**: p. S63-7.
86. Nich, C. and S.B. Goodman, *Role of macrophages in the biological reaction to wear debris from joint replacements*. *J Long Term Eff Med Implants*, 2014. **24**(4): p. 259-65.
87. O'Neill, S.C., et al., *The role of osteoblasts in peri-prosthetic osteolysis*. *Bone Joint J*, 2013. **95-b**(8): p. 1022-6.
88. Pandey, R., et al., *Arthroplasty implant biomaterial particle associated macrophages differentiate into lacunar bone resorbing cells*. *Ann Rheum Dis*, 1996. **55**(6): p. 388-95.
89. Goodman, S.B., E. Gibon, and Z. Yao, *The basic science of periprosthetic osteolysis*. *Instr Course Lect*, 2013. **62**: p. 201-6.
90. Allen, M., et al., *The effects of particulate polyethylene at a weight-bearing bone-implant interface. A study in rats*. *J Bone Joint Surg Br*, 1996. **78**(1): p. 32-7.
91. Wang, M.L., P.F. Sharkey, and R.S. Tuan, *Particle bioreactivity and wear-mediated osteolysis*. *J Arthroplasty*, 2004. **19**(8): p. 1028-38.
92. Jiang, Y., et al., *Titanium particle-challenged osteoblasts promote osteoclastogenesis and osteolysis in a murine model of periprosthetic osteolysis*. *Acta Biomater*, 2013. **9**(7): p. 7564-72.
93. Lochner, K., et al., *The potential role of human osteoblasts for periprosthetic osteolysis following exposure to wear particles*. *Int J Mol Med*, 2011. **28**(6): p. 1055-63.
94. Green, T.R., et al., *Polyethylene particles of a 'critical size' are necessary for the induction of cytokines by macrophages in vitro*. *Biomaterials*, 1998. **19**(24): p. 2297-302.
95. Hofbauer, L.C., et al., *Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells*. *Bone*, 1999. **25**(3): p. 255-9.
96. Vermes, C., et al., *Particulate wear debris activates protein tyrosine kinases and nuclear factor kappaB, which down-regulates type I collagen synthesis in human osteoblasts*. *J Bone Miner Res*, 2000. **15**(9): p. 1756-65.
97. Koreny, T., et al., *The role of fibroblasts and fibroblast-derived factors in periprosthetic osteolysis*. *Arthritis Rheum*, 2006. **54**(10): p. 3221-32.
98. Rao, A.J., et al., *Revision joint replacement, wear particles, and macrophage polarization*. *Acta Biomater*, 2012. **8**(7): p. 2815-23.
99. Udagawa, N., et al., *Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(18): p. 7260-4.
100. Suda, T., et al., *Modulation of osteoclast differentiation by local factors*. *Bone*, 1995. **17**(2 Suppl): p. 87s-91s.

101. Quinn, J.M., et al., *Human osteoclast formation from blood monocytes, peritoneal macrophages, and bone marrow cells*. Calcif Tissue Int, 1998. **62**(6): p. 527-31.
102. Sabokbar, A., R. Pandey, and N.A. Athanasou, *The effect of particle size and electrical charge on macrophage-osteoclast differentiation and bone resorption*. J Mater Sci Mater Med, 2003. **14**(9): p. 731-8.
103. Boyce, B.F. and L. Xing, *Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin*. Arthritis Res Ther, 2007. **9 Suppl 1**: p. S1.
104. Mandelin, J., et al., *Imbalance of RANKL/RANK/OPG system in interface tissue in loosening of total hip replacement*. J Bone Joint Surg Br, 2003. **85**(8): p. 1196-201.
105. Nakagawa, N., et al., *RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **253**(2): p. 395-400.
106. Theill, L.E., W.J. Boyle, and J.M. Penninger, *RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 795-823.
107. Kong, Y.Y., et al., *OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis*. Nature, 1999. **397**(6717): p. 315-23.
108. Burgess, T.L., et al., *The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts*. J Cell Biol, 1999. **145**(3): p. 527-38.
109. Glantschnig, H., et al., *M-CSF, TNFalpha and RANK ligand promote osteoclast survival by signaling through mTOR/S6 kinase*. Cell Death Differ, 2003. **10**(10): p. 1165-77.
110. Fuller, K., et al., *TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts*. J Exp Med, 1998. **188**(5): p. 997-1001.
111. Yoshitake, F., et al., *Interleukin-6 directly inhibits osteoclast differentiation by suppressing receptor activator of NF-kappaB signaling pathways*. J Biol Chem, 2008. **283**(17): p. 11535-40.
112. Atkins, G.J., et al., *The induction of a catabolic phenotype in human primary osteoblasts and osteocytes by polyethylene particles*. Biomaterials, 2009. **30**(22): p. 3672-81.
113. Wang, C.T., et al., *Over-expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL), inflammatory cytokines, and chemokines in periprosthetic osteolysis of loosened total hip arthroplasty*. Biomaterials, 2010. **31**(1): p. 77-82.
114. Marques, E.M., et al., *The choice between hip prosthetic bearing surfaces in total hip replacement: a protocol for a systematic review and network meta-analysis*. Syst Rev, 2016. **5**: p. 19.
115. McKee, G., *10 Development of Total Prosthetic Replacement of the Hip*. Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007), 1970. **72**: p. 85-103.
116. Pastides, P.S., et al., *Trunnionosis: A pain in the neck*. World J Orthop, 2013. **4**(4): p. 161-6.
117. Jacobs, J.J., et al., *Osteolysis: basic science*. Clin Orthop Relat Res, 2001(393): p. 71-7.
118. Anderson, J.M., A. Rodriguez, and D.T. Chang, *Foreign body reaction to biomaterials*. Semin Immunol, 2008. **20**(2): p. 86-100.
119. Neale, S.D. and N.A. Athanasou, *Cytokine receptor profile of arthroplasty macrophages, foreign body giant cells and mature osteoclasts*. Acta Orthop Scand, 1999. **70**(5): p. 452-8.
120. Paulus, A.C., et al., *Histopathological Analysis of PEEK Wear Particle Effects on the Synovial Tissue of Patients*. Biomed Res Int, 2016. **2016**: p. 2198914.
121. Henson, P.M., *The immunologic release of constituents from neutrophil leukocytes. II. Mechanisms of release during phagocytosis, and adherence to nonphagocytosable surfaces*. J Immunol, 1971. **107**(6): p. 1547-57.
122. Henson, P.M., *The immunologic release of constituents from neutrophil leukocytes. I. The role of antibody and complement on nonphagocytosable surfaces or phagocytosable particles*. J Immunol, 1971. **107**(6): p. 1535-46.

123. Brodbeck, W.G., et al., *Influence of biomaterial surface chemistry on the apoptosis of adherent cells*. J Biomed Mater Res, 2001. **55**(4): p. 661-8.
124. Oparaugo, P.C., et al., *Correlation of wear debris-induced osteolysis and revision with volumetric wear-rates of polyethylene: a survey of 8 reports in the literature*. Acta Orthop Scand, 2001. **72**(1): p. 22-8.
125. Kurtz, S.M., *UHMWPE biomaterials handbook: ultra high molecular weight polyethylene in total joint replacement and medical devices*. 2009: Academic Press.
126. Goodman, S.B., et al., *Biocompatibility of total joint replacements: A review*. J Biomed Mater Res A, 2009. **90**(2): p. 603-18.
127. Potnis, P.A., D.K. Dutta, and S.C. Wood, *Toll-like receptor 4 signaling pathway mediates proinflammatory immune response to cobalt-alloy particles*. Cell Immunol, 2013. **282**(1): p. 53-65.
128. Jacobs, J.J., P.A. Campbell, and T.K. Y, *How has the biologic reaction to wear particles changed with newer bearing surfaces?* J Am Acad Orthop Surg, 2008. **16 Suppl 1**: p. S49-55.
129. Brown, C., J. Fisher, and E. Ingham, *Biological effects of clinically relevant wear particles from metal-on-metal hip prostheses*. Proc Inst Mech Eng H, 2006. **220**(2): p. 355-69.
130. Pandit, H., et al., *Necrotic granulomatous pseudotumours in bilateral resurfacing hip arthroplasties: evidence for a type IV immune response*. Virchows Arch, 2008. **453**(5): p. 529-34.
131. Pandit, H., et al., *Pseudotumours associated with metal-on-metal hip resurfacings*. J Bone Joint Surg Br, 2008. **90**(7): p. 847-51.
132. Willert, H.G., et al., *Metal-on-metal bearings and hypersensitivity in patients with artificial hip joints. A clinical and histomorphological study*. J Bone Joint Surg Am, 2005. **87**(1): p. 28-36.
133. Kwon, Y.M., et al., *Analysis of wear of retrieved metal-on-metal hip resurfacing implants revised due to pseudotumours*. J Bone Joint Surg Br, 2010. **92**(3): p. 356-61.
134. Kwon, Y.M., et al., *Lymphocyte proliferation responses in patients with pseudotumors following metal-on-metal hip resurfacing arthroplasty*. J Orthop Res, 2010. **28**(4): p. 444-50.
135. Liu, F., et al., *Effect of wear of bearing surfaces on elastohydrodynamic lubrication of metal-on-metal hip implants*. Proc Inst Mech Eng H, 2005. **219**(5): p. 319-28.
136. Doorn, P.F., et al., *Tissue reaction to metal on metal total hip prostheses*. Clin Orthop Relat Res, 1996(329 Suppl): p. S187-205.
137. Case, C.P., et al., *Widespread dissemination of metal debris from implants*. J Bone Joint Surg Br, 1994. **76**(5): p. 701-12.
138. Urban, R.M., et al., *Accumulation in liver and spleen of metal particles generated at nonbearing surfaces in hip arthroplasty*. J Arthroplasty, 2004. **19**(8 Suppl 3): p. 94-101.
139. Witzleb, W.C., et al., *Exposure to chromium, cobalt and molybdenum from metal-on-metal total hip replacement and hip resurfacing arthroplasty*. Acta Orthop, 2006. **77**(5): p. 697-705.
140. Caicedo, M.S., et al., *Soluble and particulate Co-Cr-Mo alloy implant metals activate the inflammasome danger signaling pathway in human macrophages: a novel mechanism for implant debris reactivity*. J Orthop Res, 2009. **27**(7): p. 847-54.
141. Catelas, I., et al., *TNF-alpha secretion and macrophage mortality induced by cobalt and chromium ions in vitro-qualitative analysis of apoptosis*. Biomaterials, 2003. **24**(3): p. 383-91.
142. Lin, H.Y. and J.D. Bumgardner, *In vitro biocorrosion of Co-Cr-Mo implant alloy by macrophage cells*. J Orthop Res, 2004. **22**(6): p. 1231-6.
143. Magone, K., D. Luckenbill, and T. Goswami, *Metal ions as inflammatory initiators of osteolysis*. Arch Orthop Trauma Surg, 2015. **135**(5): p. 683-95.

144. Hosman, A.H., et al., *Effects of metal-on-metal wear on the host immune system and infection in hip arthroplasty*. Acta Orthop, 2010. **81**(5): p. 526-34.
145. Wang, S., et al., *The Protective Effect of Bafilomycin A1 Against Cobalt Nanoparticle-Induced Cytotoxicity and Aseptic Inflammation in Macrophages In Vitro*. Biol Trace Elem Res, 2016. **169**(1): p. 94-105.
146. De Smet, K., et al., *Metal ion measurement as a diagnostic tool to identify problems with metal-on-metal hip resurfacing*. J Bone Joint Surg Am, 2008. **90 Suppl 4**: p. 202-8.
147. Langton, D.J., et al., *The clinical implications of elevated blood metal ion concentrations in asymptomatic patients with MoM hip resurfacings: a cohort study*. BMJ Open, 2013. **3**(3).
148. Lehtovirta, L., et al., *Analysis of bearing wear, whole blood and synovial fluid metal ion concentrations and histopathological findings in patients with failed ASR hip resurfacings*. BMC Musculoskelet Disord, 2017. **18**(1): p. 523.
149. Liow, M.H., et al., *Metal Ion Levels Are Not Correlated With Histopathology of Adverse Local Tissue Reactions in Taper Corrosion of Total Hip Arthroplasty*. J Arthroplasty, 2016. **31**(8): p. 1797-802.
150. Kwon, Y.M., et al., *Sensitivity and Specificity of Metal Ion Levels in Predicting "Pseudotumors" due to Taper Corrosion in Patients With Dual Taper Modular Total Hip Arthroplasty*. J Arthroplasty, 2017. **32**(3): p. 996-1000.
151. Shrivastava, R., et al., *Effects of chromium on the immune system*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2002. **34**(1): p. 1-7.
152. Ladon, D., et al., *Changes in metal levels and chromosome aberrations in the peripheral blood of patients after metal-on-metal hip arthroplasty*. J Arthroplasty, 2004. **19**(8 Suppl 3): p. 78-83.
153. Savarino, L., et al., *Sister chromatid exchanges and ion release in patients wearing fracture fixation devices*. J Biomed Mater Res, 2000. **50**(1): p. 21-6.
154. Cadosch, D., et al., *Metal is not inert: role of metal ions released by biocorrosion in aseptic loosening--current concepts*. J Biomed Mater Res A, 2009. **91**(4): p. 1252-62.
155. Watters, T.S., et al., *Aseptic lymphocyte-dominated vasculitis-associated lesion: a clinicopathologic review of an underrecognized cause of prosthetic failure*. Am J Clin Pathol, 2010. **134**(6): p. 886-93.
156. Hallab, N.J., et al., *Concentration- and composition-dependent effects of metal ions on human MG-63 osteoblasts*. J Biomed Mater Res, 2002. **60**(3): p. 420-33.
157. Vermes, C., et al., *The potential role of the osteoblast in the development of periprosthetic osteolysis: review of in vitro osteoblast responses to wear debris, corrosion products, and cytokines and growth factors*. J Arthroplasty, 2001. **16**(8 Suppl 1): p. 95-100.
158. Wang, J.Y., et al., *Prosthetic metals interfere with the functions of human osteoblast cells in vitro*. Clin Orthop Relat Res, 1997(339): p. 216-26.
159. Triclot, P., *Metal-on-metal: history, state of the art (2010)*. Int Orthop, 2011. **35**(2): p. 201-6.
160. Brach Del Prever, E.M., et al., *UHMWPE for arthroplasty: past or future?* J Orthop Traumatol, 2009. **10**(1): p. 1-8.
161. Charnley, J. and D.K. Halley, *Rate of wear in total hip replacement*. Clin Orthop Relat Res, 1975(112): p. 170-9.
162. Wroblewski, B.M., et al., *External wear of the polyethylene socket in cemented total hip arthroplasty*. J Bone Joint Surg Br, 1987. **69**(1): p. 61-3.
163. Dumbleton, J.H., M.T. Manley, and A.A. Edidin, *A literature review of the association between wear rate and osteolysis in total hip arthroplasty*. J Arthroplasty, 2002. **17**(5): p. 649-61.
164. Ansari, F., M.D. Ries, and L. Pruitt, *Effect of processing, sterilization and crosslinking on UHMWPE fatigue fracture and fatigue wear mechanisms in joint arthroplasty*. J Mech Behav Biomed Mater, 2016. **53**: p. 329-340.

165. Hopper, R.H., Jr., et al., *Effect of terminal sterilization with gas plasma or gamma radiation on wear of polyethylene liners*. J Bone Joint Surg Am, 2003. **85**(3): p. 464-8.
166. McKellop, H., et al., *Effect of sterilization method and other modifications on the wear resistance of acetabular cups made of ultra-high molecular weight polyethylene. A hip-simulator study*. J Bone Joint Surg Am, 2000. **82**(12): p. 1708-25.
167. Dumbleton, J.H. and M.T. Manley, *Metal-on-Metal total hip replacement: what does the literature say?* J Arthroplasty, 2005. **20**(2): p. 174-88.
168. D'Antonio, J.A., et al., *Five-year experience with Crossfire highly cross-linked polyethylene*. Clin Orthop Relat Res, 2005. **441**: p. 143-50.
169. Gupta, S.K., et al., *Osteolysis after total knee arthroplasty*. J Arthroplasty, 2007. **22**(6): p. 787-99.
170. Liao, Y., et al. *Effects of resin and dose on wear and mechanical properties of cross-linked thermally stabilized UHMWPE*. in *Society for Biomaterials, the 7th World Biomaterials Congress, Sydney, Australia*. 2004.
171. Digas, G., et al., *The Otto Aufranc Award. Highly cross-linked polyethylene in total hip arthroplasty: randomized evaluation of penetration rate in cemented and uncemented sockets using radiostereometric analysis*. Clin Orthop Relat Res, 2004(429): p. 6-16.
172. Wyles, C.C., et al., *There Are No Differences in Short- to Mid-term Survivorship Among Total Hip-bearing Surface Options: A Network Meta-analysis*. Clin Orthop Relat Res, 2015. **473**(6): p. 2031-41.
173. Manning, D.W., et al., *In vivo comparative wear study of traditional and highly cross-linked polyethylene in total hip arthroplasty*. J Arthroplasty, 2005. **20**(7): p. 880-6.
174. Martell, J.M., J.J. Verner, and S.J. Incavo, *Clinical performance of a highly cross-linked polyethylene at two years in total hip arthroplasty: a randomized prospective trial*. J Arthroplasty, 2003. **18**(7 Suppl 1): p. 55-9.
175. Devane, P.A., et al., *Highly Cross-Linked Polyethylene Reduces Wear and Revision Rates in Total Hip Arthroplasty: A 10-Year Double-Blinded Randomized Controlled Trial*. J Bone Joint Surg Am, 2017. **99**(20): p. 1703-1714.
176. Feghali, C.A. and T.M. Wright, *Cytokines in acute and chronic inflammation*. Front Biosci, 1997. **2**: p. d12-26.
177. Rink, L., A. Kruse, and H. Haase, *Immunologie für Einsteiger*. 2012: Springer.
178. Loppnow, H., *[Cytokines: classification, receptors, mechanisms of action]*. Internist (Berl), 2001. **42**(1): p. 13-4, 17-27.
179. Stea, S., et al., *Cytokines and osteolysis around total hip prostheses*. Cytokine, 2000. **12**(10): p. 1575-9.
180. Shanbhag, A.S., et al., *Nitric oxide release by macrophages in response to particulate wear debris*. J Biomed Mater Res, 1998. **41**(3): p. 497-503.
181. Liu, A., et al., *The biological response to nanometre-sized polymer particles*. Acta Biomater, 2015. **23**: p. 38-51.
182. Thomas, L. and M. Messinger, *Pathobiochemie und Labordiagnostik der Entzündung*. LABORATORIUMS MEDIZIN, 1993. **17**: p. 179-179.
183. Vollmar, A., et al., *Immunologie: Grundlagen und Wirkstoffe*. 2005: WVG, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
184. Murphy, K.P., P. Travers, and M. Walport, *Janeway Immunologie Spektrum Akad. Verl, Heidelberg*, 2009.
185. Büttner, R., *Allgemeine Pathologie: mit 15 Tabellen*. 2003: Schattauer Verlag.
186. Dinarello, C.A., *Blocking IL-1 in systemic inflammation*. J Exp Med, 2005. **201**(9): p. 1355-9.
187. Hallab, N.J., *Biologic Responses to Orthopedic Implants: Innate and Adaptive Immune Responses to Implant Debris*. Spine (Phila Pa 1976), 2016. **41** Suppl 7: p. S30-1.
188. Luttmann, W., et al., *Der Experimentator: Immunologie*. 2014: Springer-Verlag.
189. Böcker, D., H. Heitz, and M. Kreipe, *Pathologie 5. Auflage*. 2012.

190. Charbonneau, H., et al., *The leukocyte common antigen (CD45): a putative receptor-linked protein tyrosine phosphatase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(19): p. 7182-6.
191. Poppema, S., et al., *CD45 (leukocyte common antigen) expression in T and B lymphocyte subsets*. Leuk Lymphoma, 1996. **20**(3-4): p. 217-22.
192. Rogers, P.R., et al., *CD45 alternative exon expression in murine and human CD4+ T cell subsets*. J Immunol, 1992. **148**(12): p. 4054-65.
193. Tchilian, E.Z. and P.C. Beverley, *CD45 in memory and disease*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2002. **50**(2): p. 85-93.
194. Tchilian, E.Z. and P.C. Beverley, *Altered CD45 expression and disease*. Trends Immunol, 2006. **27**(3): p. 146-53.
195. Donovan, J.A. and G.A. Koretzky, *CD45 and the immune response*. J Am Soc Nephrol, 1993. **4**(4): p. 976-85.
196. Haidl, I.D., et al., *Detection of restricted isoform expression and tyrosine phosphatase activity of CD45 in murine dendritic cells*. Eur J Immunol, 1995. **25**(12): p. 3370-4.
197. Saunders, A.E. and P. Johnson, *Modulation of immune cell signalling by the leukocyte common tyrosine phosphatase, CD45*. Cell Signal, 2010. **22**(3): p. 339-48.
198. Hermiston, M.L., Z. Xu, and A. Weiss, *CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 107-37.
199. Kung, C., et al., *Mutations in the tyrosine phosphatase CD45 gene in a child with severe combined immunodeficiency disease*. Nat Med, 2000. **6**(3): p. 343-5.
200. Tchilian, E.Z., et al., *A deletion in the gene encoding the CD45 antigen in a patient with SCID*. J Immunol, 2001. **166**(2): p. 1308-13.
201. Chistiakov, D.A., et al., *CD68/macrosialin: not just a histochemical marker*. Lab Invest, 2017. **97**(1): p. 4-13.
202. van Furth, R., *Cells of the mononuclear phagocyte system*. 1980: Springer.
203. Xing, S., et al., *The effect of polyethylene particle phagocytosis on the viability of mature human macrophages*. J Biomed Mater Res, 2002. **61**(4): p. 619-27.
204. Martin, T.J. and K.W. Ng, *Mechanisms by which cells of the osteoblast lineage control osteoclast formation and activity*. J Cell Biochem, 1994. **56**(3): p. 357-66.
205. Fujikawa, Y., et al., *The human osteoclast precursor circulates in the monocyte fraction*. Endocrinology, 1996. **137**(9): p. 4058-60.
206. Ren, W., et al., *Macrophage depletion diminishes implant-wear-induced inflammatory osteolysis in a mouse model*. J Biomed Mater Res A, 2008. **85**(4): p. 1043-51.
207. Greidanus, N.V., et al., *Quality of life outcomes in revision versus primary total knee arthroplasty*. J Arthroplasty, 2011. **26**(4): p. 615-20.
208. Cheng, X., et al., *Biological Reactions to Metal Particles and Ions in the Synovial Layer of Mice*. Materials (Basel), 2020. **13**(5).
209. Utzschneider, S., et al., *Inflammatory response against different carbon fiber-reinforced PEEK wear particles compared with UHMWPE in vivo*. Acta Biomater, 2010. **6**(11): p. 4296-304.
210. Paulus, A.C., et al., *Histopathological Analysis of PEEK Wear Particle Effects on the Synovial Tissue of Patients*. Biomed Res Int, 2016. **2016**: p. 2198914.
211. Paulus, A.C., et al., *Local Biological Reactions and Pseudotumor-Like Tissue Formation in relation to Metal Wear in a Murine In Vivo Model*. Biomed Res Int, 2019. **2019**: p. 3649838.
212. Utzschneider S., B.R., Kretzer JP. , *DFG - Antrag, Biologische Aktivität metallischer Abriebpartikel und Metallionen in vitro und in vivo*. Deutsche Forschungsgesellschaft 2013.
213. JP., K., *Partikelanalyse Metall. Bereitgestellte Analyseergebnisse*.
214. JP., K., *Generierung von Metallionen. Zusammensetzung der Lösung. Bereitgestellte Analysedaten*.

215. Niedzwiecki, S., et al., *Comparison of three joint simulator wear debris isolation techniques: acid digestion, base digestion, and enzyme cleavage*. J Biomed Mater Res, 2001. **56**(2): p. 245-9.
216. Paulus, A., et al., *Evaluation of different methods to eliminate adherent endotoxin of polyethylene wear particles*. Wear, 2012. **295**: p. 319-325.
217. Lang, G., *Immunhistochemie*, in *Histotechnik*. 2013, Springer. p. 269-304.
218. DCS, I.D.-S., *Leitfaden für Immunhistochemie*.
219. Greenfield, E.M., et al., *Does endotoxin contribute to aseptic loosening of orthopedic implants?* J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2005. **72**(1): p. 179-85.
220. Wooley, P.H. and E.M. Schwarz, *Aseptic loosening*. Gene Ther, 2004. **11**(4): p. 402-7.
221. al-Saffar, N. and P.A. Revell, *Pathology of the bone-implant interfaces*. J Long Term Eff Med Implants, 1999. **9**(4): p. 319-47.
222. Ingham, E., et al., *Production of TNF-alpha and bone resorbing activity by macrophages in response to different types of bone cement particles*. Biomaterials, 2000. **21**(10): p. 1005-13.
223. Chiba, J., et al., *The characterization of cytokines in the interface tissue obtained from failed cementless total hip arthroplasty with and without femoral osteolysis*. Clin Orthop Relat Res, 1994(300): p. 304-12.
224. Kim, K.J., J. Chiba, and H.E. Rubash, *In vivo and in vitro analysis of membranes from hip prostheses inserted without cement*. J Bone Joint Surg Am, 1994. **76**(2): p. 172-80.
225. Bauer, T.W., *Particles and periimplant bone resorption*. Clin Orthop Relat Res, 2002(405): p. 138-43.
226. Konttinen, Y.T., et al., *The microenvironment around total hip replacement prostheses*. Clin Orthop Relat Res, 2005(430): p. 28-38.
227. Wang, W., et al., *Biomaterial particle phagocytosis by bone-resorbing osteoclasts*. J Bone Joint Surg Br, 1997. **79**(5): p. 849-56.
228. Haynes, D.R., *Bone lysis and inflammation*. Inflamm Res, 2004. **53**(11): p. 596-600.
229. Shay, T., J.A. Lederer, and C. Benoist, *Genomic responses to inflammation in mouse models mimic humans: we concur, apples to oranges comparisons won't do*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(4): p. E346.
230. Shoda, L.K., et al., *A comprehensive review of interventions in the NOD mouse and implications for translation*. Immunity, 2005. **23**(2): p. 115-26.
231. Caicedo, M.S., et al., *Soluble ions more than particulate cobalt-alloy implant debris induce monocyte costimulatory molecule expression and release of proinflammatory cytokines critical to metal-induced lymphocyte reactivity*. J Biomed Mater Res A, 2010. **93**(4): p. 1312-21.
232. Illgen, R.L., 2nd, et al., *Highly crosslinked vs conventional polyethylene particles: relative in vivo inflammatory response*. J Arthroplasty, 2009. **24**(1): p. 117-24.
233. Neuerburg, C., et al., *Impact of vitamin E-blended UHMWPE wear particles on the osseous microenvironment in polyethylene particle-induced osteolysis*. Int J Mol Med, 2016.
234. Akbar, M., et al., *Acute inflammatory response to cobalt chromium orthopaedic wear debris in a rodent air-pouch model*. J R Soc Interface, 2012. **9**(74): p. 2109-19.
235. Howie, D.W., et al., *The synovial response to intraarticular injection in rats of polyethylene wear particles*. Clin Orthop Relat Res, 1993(292): p. 352-7.
236. Fuller, K., et al., *TNFalpha potently activates osteoclasts, through a direct action independent of and strongly synergistic with RANKL*. Endocrinology, 2002. **143**(3): p. 1108-18.
237. Utzschneider, S., et al., *Biological activity and migration of wear particles in the knee joint: an in vivo comparison of six different polyethylene materials*. J Mater Sci Mater Med, 2014. **25**(6): p. 1599-612.

238. Lass, R., et al., *Comparison of synovial fluid, urine, and serum ion levels in metal-on-metal total hip arthroplasty at a minimum follow-up of 18 years*. J Orthop Res, 2014. **32**(9): p. 1234-40.
239. Beraudi, A., et al., *Detection of cobalt in synovial fluid from metal-on-metal hip prosthesis: correlation with the ion haematic level*. Biomarkers, 2013. **18**(8): p. 699-705.
240. Papageorgiou, I., et al., *The effect of nano- and micron-sized particles of cobalt-chromium alloy on human fibroblasts in vitro*. Biomaterials, 2007. **28**(19): p. 2946-58.
241. Theoleyre, S., et al., *The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling*. Cytokine Growth Factor Rev, 2004. **15**(6): p. 457-75.
242. Brown, C., et al., *Characterisation of wear particles produced by metal on metal and ceramic on metal hip prostheses under standard and microseparation simulation*. J Mater Sci Mater Med, 2007. **18**(5): p. 819-27.
243. Huk, O.L., et al., *Induction of apoptosis and necrosis by metal ions in vitro*. J Arthroplasty, 2004. **19**(8 Suppl 3): p. 84-7.
244. Catelas, I., et al., *Quantitative analysis of macrophage apoptosis vs. necrosis induced by cobalt and chromium ions in vitro*. Biomaterials, 2005. **26**(15): p. 2441-53.
245. Boardman, D.R., F.R. Middleton, and T.G. Kavanagh, *A benign psoas mass following metal-on-metal resurfacing of the hip*. J Bone Joint Surg Br, 2006. **88**(3): p. 402-4.
246. Goodman, S.B., *Wear particles, periprosthetic osteolysis and the immune system*. Biomaterials, 2007. **28**(34): p. 5044-8.
247. Hallab, N., *Metal sensitivity in patients with orthopedic implants*. J Clin Rheumatol, 2001. **7**(4): p. 215-8.
248. Posada, O.M., R.J. Tate, and M.H. Grant, *Effects of CoCr metal wear debris generated from metal-on-metal hip implants and Co ions on human monocyte-like U937 cells*. Toxicol In Vitro, 2015. **29**(2): p. 271-80.
249. Lohmann, C.H., R. Hameister, and G. Singh, *Allergies in orthopaedic and trauma surgery*. Orthop Traumatol Surg Res, 2017. **103**(1s): p. S75-s81.
250. Marshall, J.S., et al., *An introduction to immunology and immunopathology*. Allergy Asthma Clin Immunol, 2018. **14**(Suppl 2): p. 49.
251. Mestas, J. and C.C. Hughes, *Of mice and not men: differences between mouse and human immunology*. J Immunol, 2004. **172**(5): p. 2731-8.
252. Jacobs, J.J., et al., *Metal degradation products: a cause for concern in metal-metal bearings?* Clin Orthop Relat Res, 2003(417): p. 139-47.
253. Gallo, J., et al., *Osteolysis around total knee arthroplasty: a review of pathogenetic mechanisms*. Acta Biomater, 2013. **9**(9): p. 8046-58.
254. Athanasou, N.A. and J. Quinn, *Immunophenotypic differences between osteoclasts and macrophage polykaryons: immunohistological distinction and implications for osteoclast ontogeny and function*. J Clin Pathol, 1990. **43**(12): p. 997-1003.
255. Shah, V.O., C.I. Civin, and M.R. Loken, *Flow cytometric analysis of human bone marrow. IV. Differential quantitative expression of T-200 common leukocyte antigen during normal hemopoiesis*. J Immunol, 1988. **140**(6): p. 1861-7.
256. Lacal, P., et al., *Intracellular location of T200 and Mo1 glycoproteins in human neutrophils*. J Biol Chem, 1988. **263**(20): p. 9946-51.
257. Morawietz, L., et al., *Twenty-three neutrophil granulocytes in 10 high-power fields is the best histopathological threshold to differentiate between aseptic and septic endoprosthesis loosening*. Histopathology, 2009. **54**(7): p. 847-53.
258. Pandey, R., E. Drakoulakis, and N.A. Athanasou, *An assessment of the histological criteria used to diagnose infection in hip revision arthroplasty tissues*. J Clin Pathol, 1999. **52**(2): p. 118-23.
259. Nieminen, P. and E. Saksela, *NK-9, a distinct sialylated antigen of the T200 family*. Eur J Immunol, 1986. **16**(5): p. 513-8.

260. Street, S.E., et al., *Innate immune surveillance of spontaneous B cell lymphomas by natural killer cells and gammadelta T cells*. J Exp Med, 2004. **199**(6): p. 879-84.
261. Lunemann, S., et al., *Compromised function of natural killer cells in acute and chronic viral hepatitis*. J Infect Dis, 2014. **209**(9): p. 1362-73.
262. Leung, K.N. and G.L. Ada, *Induction of natural killer cells during murine influenza virus infection*. Immunobiology, 1981. **160**(3-4): p. 352-66.
263. Guo, H., et al., *The functional impairment of natural killer cells during influenza virus infection*. Immunol Cell Biol, 2009. **87**(8): p. 579-89.
264. Lin, T.H., et al., *Exposure of polyethylene particles induces interferon-gamma expression in a natural killer T lymphocyte and dendritic cell coculture system in vitro: a preliminary study*. J Biomed Mater Res A, 2015. **103**(1): p. 71-5.
265. Huss, R.S., et al., *Synovial tissue-infiltrating natural killer cells in osteoarthritis and periprosthetic inflammation*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(12): p. 3799-805.
266. Kim, H.Y., et al., *NKT cells promote antibody-induced joint inflammation by suppressing transforming growth factor beta1 production*. J Exp Med, 2005. **201**(1): p. 41-7.
267. Ogunwale, B., et al., *Investigating the immunologic effects of CoCr nanoparticles*. Clin Orthop Relat Res, 2009. **467**(11): p. 3010-6.
268. Blaine, T.A., et al., *Increased levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 protein and messenger RNA in human peripheral blood monocytes due to titanium particles*. J Bone Joint Surg Am, 1996. **78**(8): p. 1181-92.
269. Iwanaga, T., et al., *Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint*. Arch Histol Cytol, 2000. **63**(1): p. 17-31.
270. Sabokbar, A., et al., *Human arthroplasty derived macrophages differentiate into osteoclastic bone resorbing cells*. Ann Rheum Dis, 1997. **56**(7): p. 414-20.
271. Barrera, P., et al., *Synovial macrophage depletion with clodronate-containing liposomes in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(9): p. 1951-9.
272. Martinez-Pomares, L., et al., *Macrophage membrane molecules: markers of tissue differentiation and heterogeneity*. Immunobiology, 1996. **195**(4-5): p. 407-16.
273. Jacobs, J.J., J.L. Gilbert, and R.M. Urban, *Corrosion of metal orthopaedic implants*. J Bone Joint Surg Am, 1998. **80**(2): p. 268-82.
274. Friesenbichler, J., et al., *Serum metal ion levels after rotating-hinge knee arthroplasty: comparison between a standard device and a megaprosthesis*. Int Orthop, 2012. **36**(3): p. 539-44.
275. Lavigne, M., et al., *Comparison of whole-blood metal ion levels in four types of metal-on-metal large-diameter femoral head total hip arthroplasty: the potential influence of the adapter sleeve*. J Bone Joint Surg Am, 2011. **93 Suppl 2**: p. 128-36.
276. Penny, J.O., et al., *Metal ion levels and lymphocyte counts: ASR hip resurfacing prosthesis vs. standard THA: 2-year results from a randomized study*. Acta Orthop, 2013. **84**(2): p. 130-7.
277. Simonsen, L.O., H. Harbak, and P. Bennekou, *Cobalt metabolism and toxicology--a brief update*. Sci Total Environ, 2012. **432**: p. 210-5.
278. Bar-Or, D., et al., *Characterization of the Co(2+) and Ni(2+) binding amino-acid residues of the N-terminus of human albumin. An insight into the mechanism of a new assay for myocardial ischemia*. Eur J Biochem, 2001. **268**(1): p. 42-7.
279. Borguet, F., et al., *Study of the chromium binding in plasma of patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis*. Clin Chim Acta, 1995. **238**(1): p. 71-84.
280. Clodfelder, B.J., et al., *The trail of chromium(III) in vivo from the blood to the urine: the roles of transferrin and chromodulin*. J Biol Inorg Chem, 2001. **6**(5-6): p. 608-17.
281. Hallab, N.J., A. Skipor, and J.J. Jacobs, *Interfacial kinetics of titanium-and cobalt-based implant alloys in human serum: Metal release and biofilm formation*. Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, 2003. **65**(3): p. 311-318.

282. Delaunay, C., et al., *Metal-on-metal bearings total hip arthroplasty: the cobalt and chromium ions release concern*. Orthop Traumatol Surg Res, 2010. **96**(8): p. 894-904.
283. Jonitz-Heincke, A., et al., *The Impact of Metal Ion Exposure on the Cellular Behavior of Human Osteoblasts and PBMCs: In Vitro Analyses of Osteolytic Processes*. Materials (Basel), 2017. **10**(7).
284. Kwon, Y.-M., et al., *Dose-dependent cytotoxicity of clinically relevant cobalt nanoparticles and ions on macrophages in vitro*. Biomedical materials, 2009. **4**(2): p. 025018.
285. Lundborg, M., et al., *Phagolysosomal pH and dissolution of cobalt oxide particles by alveolar macrophages*. Environ Health Perspect, 1992. **97**: p. 153-7.
286. Niki, Y., et al., *Metal ions induce bone-resorbing cytokine production through the redox pathway in synoviocytes and bone marrow macrophages*. Biomaterials, 2003. **24**(8): p. 1447-57.
287. Taki, N., et al., *Polyethylene and titanium particles induce osteolysis by similar, lymphocyte-independent, mechanisms*. J Orthop Res, 2005. **23**(2): p. 376-83.
288. Kobayashi, Y., K.J. Kim, and T. Itoh, *Gene expression of bone-resorbing cytokines in rat osteolysis model*. J Orthop Sci, 2005. **10**(1): p. 62-9.
289. Merkel, K.D., et al., *Tumor necrosis factor-alpha mediates orthopedic implant osteolysis*. Am J Pathol, 1999. **154**(1): p. 203-10.
290. Schwarz, E.M., et al., *Tumor necrosis factor-alpha/nuclear transcription factor-kappaB signaling in periprosthetic osteolysis*. J Orthop Res, 2000. **18**(3): p. 472-80.
291. Childs, L.M., et al., *Efficacy of etanercept for wear debris-induced osteolysis*. J Bone Miner Res, 2001. **16**(2): p. 338-47.
292. Wilkinson, J.M., et al., *Variation in the TNF gene promoter and risk of osteolysis after total hip arthroplasty*. J Bone Miner Res, 2003. **18**(11): p. 1995-2001.
293. Konttinen, Y.T., et al., *Interleukin-1 and collagenases around loosening total hip prostheses*. Clin Exp Rheumatol, 1996. **14**(3): p. 255-62.
294. Epstein, N.J., et al., *Interleukin-1 modulates periprosthetic tissue formation in an intramedullary model of particle-induced inflammation*. J Orthop Res, 2005. **23**(3): p. 501-10.
295. Konttinen, Y.T., et al., *Interleukin-6 in aseptic loosening of total hip replacement prostheses*. Clin Exp Rheumatol, 2002. **20**(4): p. 485-90.
296. Gordon, A., et al., *Polymorphisms in the interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-6 genes affect risk of osteolysis in patients with total hip arthroplasty*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(10): p. 3157-65.
297. Wei, S., et al., *IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis*. J Clin Invest, 2005. **115**(2): p. 282-90.
298. Kaufman, A.M., et al., *Human macrophage response to UHMWPE, TiAlV, CoCr, and alumina particles: analysis of multiple cytokines using protein arrays*. J Biomed Mater Res A, 2008. **84**(2): p. 464-74.
299. Lohmann, C.H., et al., *Periprosthetic tissue metal content but not serum metal content predicts the type of tissue response in failed small-diameter metal-on-metal total hip arthroplasties*. J Bone Joint Surg Am, 2013. **95**(17): p. 1561-8.

13 Danksagung

Großer Dank gilt vor allem meiner Doktormutter Frau **Prof. Dr. med. Sandra Utzschneider** für die sehr gute Betreuung, Unterstützung in allen Belangen und den vollen Rückhalt sowie die fachliche Begleitung während der gesamten Arbeit.

Ich danke Herrn **Prof. Dr. med. Dipl. - Ing. Volkmar Jansson** für die Ermöglichung dieser Forschungsarbeit sowie für seine Unterstützung, vor allem im Lösen des ein oder anderen „gordischen Knotens“.

Großer Dank gilt auch Frau **Dr. med. Antje Hentrich**, Leiterin der Munich Medical Research School, für ihre Hilfe und Unterstützung.

Ebenso möchte ich Herrn **Prof. em. Dr. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR, ML**, Vorsitzender der Fakultätskommission „Selbstkontrolle in der Wissenschaft“ für seine Unterstützung und Hilfe danken.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn **Dr. med. Alexander Crispin** für die Beratung bei der statistischen Auswertung bedanken sowie bei der MTA, Frau **Sandra Haßelt** für ihre Geduld und Unterstützung bei der experimentellen Arbeit im Labor.

Sämtlichen Partnern dieses DFG - Projektes und der Arbeitsgruppe möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken. Den Dank für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit möchte ich der **Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG)** aussprechen.

Meinen Eltern kann ich gar nicht genug danken für die Liebe und bedingungslose Unterstützung während des gesamten Studiums sowie bei diesem Promotionsvorhaben, welches ohne sie schwerer gewesen wäre. Danke für einfach Alles!

Eidesstattliche Versicherung

Dirmeier, Sabine

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Immunhistochemische Analyse der Entzündungsreaktion im murinen Kniegelenk nach Partikel- / Ionenstimulation

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Füssen, 11.11.2021

Dirmeier Sabine

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin